3977

DER HARNSÄURE-TRANSPORT IN ERYTHROZYTEN VON BEAGLE- UND DALMATINER-HUNDEN

Karl Hoferer

Diss.
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534907_0001

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. Giesecke

DER HARNSÄURE-TRANSPORT IN ERYTHROZYTEN VON BEAGLE- UND DALMATINER-HUNDEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Karl Hoferer

aus

Gengenbach

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Dekan: Prof.Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. D. Giesecke

Korreferent: Prof. Dr. H. Kraft

Tag der Promotion: 27. Juli 1984

In Dankbarkeit

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1.	Über die Sonderstellung des Dalmatiner-Hundes im Harnsäure-Metabolismus	1
1.2.	Das Harnsäure-Transportsystem in der Niere und in anderen Organen bei verschiedenen Spezies	2
1.3.	Das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten des Dalmatiners und anderen Spezies	5
1.4.	PROBLEMSTELLUNG	8
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1.	Prinzip der Transportmessung	9
2.2.	Versuchstiere und Versuchstierhaltung	9
2.3.	Fütterung	10
2.4.	Blutentnahme und Isolierung der Erythrozyten	13
2.5.	Einfluß des pH und der Temperatur auf die Stabilität der Erythrozytenmembran	14
2.6.	Bestimmung der Erythrozytenvolumina	17
2.7.	Bestimmung des Harnsäure-Transportes in Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner	19
2.7.1.	Abhängigkeit der Harnsäureaufnahme von der Zeit, Anfangskonzentration, Temperatur und vom pH-Wert	20
2.7.2.	Inhibition der Harnsäureaufnahme	21
2.7.3.	Nachweis der beschleunigten Austauschdiffusion	22
2.8.	Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der markierten Harnsäurelösung	22
2.9.	Berechnung der kinetischen Größen	23
2.10.	Statistische Methoden	24
3.	ERGEBNISSE	25
3.1.	Zeitabhängigkeit der Harnsäureaufnahme	25
3.2.	Abhängigkeit der Harnsäure-Aufnahme von der Inkubationskonzentration	29

Seite

3.3. Temperaturabhängigkeit der Harnsäure-Aufnahme 35

3.4. Einfluß von Inhibitoren auf die Harnsäure-Aufnahme von Erythrozyten 39

3.5. Einfluß des pH-Wertes auf die Harnsäure-Aufnahme von Erythrozyten 44

3.6. Nachweis der beschleunigten Austauschdiffusion für das Harnsäure-Transportsystem von Erythrozyten 49

4. DISKUSSION 53

4.1. Die Harnsäure-Aufnahme in Erythrozyten von Dalmatinern und Beagle 53

4.2. Rassebedingte Unterschiede zwischen der Harnsäure-Aufnahme in Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner 58

4.3. Fütterungseinflüsse durch SCP- und Casein-Diät auf die Harnsäure-Aufnahme 59

5. ZUSAMMENFASSUNG 62

SUMMARY 64

6. LITERATURVERZEICHNIS 66

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1. Über die Sonderstellung des Dalmatiner-Hundes im Harnsäure-Metabolismus

Die Besonderheit der Dalmatiner-Rasse, im Harn größere Mengen Harnsäure auszuscheiden, wurde zuerst von BENEDICT (1916) beschrieben. WELLS zeigte 1918, daß Dalmatiner in den Hepatozyten das Enzym Uricase besitzen, welches Harnsäure in Allantoin umwandelt, und deshalb genauso wie andere Hunde in der Lage sein müßten, Harnsäure in Allantoin zu überführen. Zum gleichen Ergebnis gelangten KLEMPERER et al. (1938), als sie nachwiesen, daß die Lebern verschiedener Hunderassen, einschließlich Dalmatiner, den gleichen Uricasegehalt aufweisen. Sie äußerten deshalb die Vermutung, daß die fehlende Oxidation von Harnsäure zu Allantoin nicht in einem Enzymmangel begründet ist, sondern auf einem defekten Harnsäuretransportsytem in der Leber der Dalmatiner beruht.

Eine andere Erklärung der Hyperuricosurie beim Dalmatiner erschien naheliegender, als man erkannte, daß der Dalmatiner eine sehr hohe renale Harnsäure-Clearance (YOUNG et al., 1938; MYERS u. HANZAL, 1946) und keine Reabsorption von Harnsäure in der Niere aufweist (FRIEDMANN u. BYERS, 1948). Beim Dalmatiner überschreitet die Harnsäure-Clearance der Niere die glomeruläre Filtrationsrate (WOLFSON et al., 1950), und er sezerniert in einer Größenordnung von 40 % der glomerulären Filtrationsrate in den Nierentubulus (ROCH-RAMEL, 1977). Arbeiten von KESSLER et al. (1959), ZINS und WEINER (1968) und MUDGE et al. (1973) führten zu der Erkenntnis, daß Harnsäure im Nierentubulus sowohl sezerniert wie reabsorbiert wird und daß der jeweilige Anteil je nach Spe-

zies variiert. Der Mensch resorbiert etwa 95 % (SORENSEN, 1976), der Nicht-Dalmatiner etwa 50 % der glomerulär filtrierten Harnsäure im proximalen Nierentubulus zurück (ROCH-RAMEL et al., 1976). ROCH-RAMEL et al. (1976) und MOULIN et al. (1982) konnten mit Hilfe eines Harnsäure-Sekretionshemmers (Pyrazincarbonsäure) auch in der Dalmatinerniere eine Harnsäure-Resorption nachweisen.

Mit Hilfe von Organtransplantationen versuchte man zu klären, ob die Niere oder die Leber des Dalmatiners für die Hyperuricämie und die Hyperuricosurie verantwortlich ist: Der Dalmatiner mit einer Nicht-Dalmatinerniere schied weiterhin große Mengen Harnsäure aus und bei Nicht-Dalmatinern mit einer Dalmatinerniere blieb die Ausscheidung von Harnsäure im Urin gering (APPLEMAN et al., 1966). Dagegen bewirkte die Transplantation der Leber eines Dalmatiners bei einem Nicht-Dalmatiner einen starken Anstieg des Harnsäure-Plasmaspiegels, die Leber eines Nicht-Dalmatiners bei einem Dalmatiner einen starken Abfall (KUSTER et al., 1972). Demnach führen Besonderheiten der Leber beim Dalmatiner zu dem hohen Harnsäurespiegel von 50 - 100 $\mu mol \cdot l^{-1}$ (MAZUE et al.,1977) gegenüber 10 - 20 $\mu mol \cdot l^{-1}$ (MUDGE et al., 1973; ROCH-RAMEL et al., 1976) bei anderen Hunderassen und etwa 300 $\mu mol \cdot l^{-1}$ (MERTZ, 1973) beim Menschen.

1.2. Das Harnsäure-Transportsystem in der Niere und in anderen Organen bei verschiedenen Spezies

Über den Harnsäuretransport in der Niere sind wir besonders gut unterrichtet. Es waren GUTMANN und YÜ (1961), die für die Harnsäureausscheidung in der Niere ein Dreikomponentensystem, bestehend aus Filtration, Sekretion und Reabsorption postulierten, wobei die letztlich überwiegende Transportrichtung im Nierentubulus je nach Spe-

zies variiert. WEINER (1979) erstellte eine Literaturübersicht und und teilte je nach Transportrichtung im Nierentubulus die Species in 4 verschiedene Gruppen:

I. Species mit ausschließlicher Harnsäure-Sekretion

- Amphibien (Phyllomedusa), Reptilien (Pseudemys, Gopherus), Vögel (Huhn, Ente, Taube), Rhesus-Affe, Mandrill, Kalb

II. Species mit Netto-Harnsäure-Sekretion unter Beteiligung von Harnsäure-Reabsorption

- Kaninchen, Dalmatiner-Hund, Schwein, Ziege

III. Species mit Netto-Harnsäure-Reabsorption ohne Sekretion

- Katze, Gibbon-, Spider-, Wooly-Affe

IV. Species mit Netto-Harnsäure-Reabsorption mit Sekretion

- Ratte, Nicht-Dalmatinerhund, Cebus-Affe, Schimpanse, Mensch

Diese auffällige Differenzierung läßt keinen Zusammenhang mit bestimmten Lebensgewohnheiten, etwa der Ernährung erkennen. Sekretion und Reabsorption von Harnsäure unterliegen einer bidirektionalen, carrierabhängigen, erleichterten Diffusion. Dies wurde in der Niere von Mensch (SORENSEN u. LEVINSON, 1975), Ratte (WEINMAN et al., 1981), Schimpanse (FANELLI et al., 1973), Hund (ROCH-RAMEL et al., 1976; YÜ, 1960; ZINS u. WEINER, 1968; BLOMSTEDT u. ARONSON, 1980), Schlange (DANTZLER, 1973), Schwein (ROCH-RAMEL et al., 1980), Kaninchen (KIPPEN et al., 1977; SENEKJIAN et al., 1981; CHONKO, 1980), Vögel und Cebus-Affen (FANELLI et al., 1970) festgestellt. Auf

die Mitbeteiligung des Anionen-Transportsytems wurde beim Hund (BLOMSTEDT u. ARONSON, 1980) hingewiesen. Neben der erleichterten Diffusion findet im proximalen Nierentubulus der Ratte auch passive Diffusion statt (WEINMANN, 1981).

Der Gastro-Intestinaltrakt ist mit rund 30 % der täglichen Harnsäureausscheidung ein wichtiger extrarenaler Ausscheidungsweg für Harnsäure beim Menschen. Die Hälfte dieser Harnsäuremenge stammt aus Speichel, Magensaft und Gallensaft, die andere Hälfte aus der Pankreas- und Darmflüssigkeit (SORENSEN, 1960). Versuche in vitro (OH et al., 1967; KHAN et al., 1975) und Versuche in vivo an umgestülpten Dünndarmsäckchen von Ratten (DUKES et al., 1982) ergaben übereinstimmend eine einfache Diffusion von Harnsäure in das Darmlumen und in die entgegengesetzte Richtung. Bei Versuchen mit umgestülpten Dünndarmsäckchen von Meermuscheln, Cryptochiton stelleri, diffundierte Harnsäure ebenfalls nur passiv durch die Dünndarmwand (HANISCH u. LAWRENCE, 1971). Nur BERLIN und HAWKINS (1968) stellten im Dünndarm von Hamstern einen 5mal höheren Harnsäurefluß von der Serosa zur Mucosa als in umgekehrter Richtung fest.

Die einfache Diffusion von Harnsäure durch die Mucosa der Magenwand beschrieben MERTZ (1970) für den Menschen und SANSOM et al., (1982) für den Frosch. Wegen der deutlich erhöhten Diffusion bei niederem pH, wird beim Menschen auf eine Diffusion von undissoziierter Harnsäure geschlossen.

In der Placenta von Meerschweinchen wurde eine relativ konstante Harnsäure-Transportrate gemessen, trotz steigender Inkubationskonzentration an Harnsäure, so daß möglicherweise ein carrierabhängiger Transport in Betracht kommt (VAN KREEL u. VAN DIJK, 1977).

1.3. Das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten des Dalmatiners und anderen Spezies

LASSEN (1961) beschrieb als erster das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten des Menschen. Danach war der Transport im Gegensatz zur einfachen Diffusion konzentrations- sowie temperaturabhängig und erhöhte sich bei niedrigeren pH-Werten. Das deutete auf einen carrierabhängigen Transport von undissoziierter Harnsäure hin. Als unspezifisch bezeichneten LASSEN und Mitarbeiter das Harnsäure-Transportsystem, als sie die deutliche kompetetive Hemmung durch Hypoxanthin (LASSEN u. OVERGAARD-HANSEN, 1962 a) und durch Purine (LASSEN u. OVERGAARD-HANSEN, 1962 b) nachweisen konnten.

GREGER et al. (1974) erkannten in Erythrozyten von Menschen und Ratten eine langsame Komponente der Harnsäureaufnahme, die den Transport in die Erythrozyten wiedergibt und eine schnelle Komponente, die nach ihrer Auffassung die Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran widerspiegelt, weil sie sich im Gegensatz zur langsamen Komponente als temperaturabhängig erwies.

LUCAS-HERON und FONTENAILLE (1977) konnten mit Hilfe von Inhibitoren des Anionentransports (Na-Salicylat, Na-Benzoat) und auch durch die Zugabe von Na-Fluorid, das in der Glykolyse das Enzym Enolase hemmt, den Harnsäure-Influx in Erythrozyten des Menschen vermindern. Sie schlossen daraus auf eine Beteiligung des Anionen-Transportsystems und auf einen glykolyseabhängigen Mechanismus.

HARVEY und CHRISTENSEN (1964) versuchten erstmals für die Hyperuricämie des Dalmatiners, trotz vorhandener Uricase, und der Hyperuricosurie eine gemeinsame Erklärung zu finden. Bei Erythrozyten von Nicht-Dalmatinern fanden sie eine Hemmung der Harnsäureaufnahme durch Hypoxanthin, nicht dagegen in Erythrozyten von Dalmatinern. Sie fol-

gerten daraus, daß in Erythrozyten von Dalmatinern ein spezifisches Harnsäure-Transportsystem fehlt. Aufgrund dieser Ergebnisse unterstellten sie einen generalisierten Transportdefekt für Harnsäure beim Dalmatiner und erklärten damit, daß die Harnsäure nicht zu dem Enzym Uricase in den Hepatozyten der Leber gelangt und in den Nierentubuli nicht reabsorbiert wird. YÜ et al. (1971) konnten bei Nicht-Dalmatinern durch die Gabe von Oxonat, einem Uricase-Inhibitor, eine erhöhte Harnsäureausscheidung hervorrufen. Da nach AFZELIUS (1965) in der Dalmatinerleber genügend Uricase vorhanden ist und das Enzym nach ANDREINI et al. (1966) im Vergleich zu Nicht-Dalmatinern sogar eine erhöhte Aktivität aufweist, unterstützten diese Autoren ebenfalls die Hypothese von einem generalisierten Transportdefekt für Harnsäure beim Dalmatiner.

Andererseits konnten DUNCAN und CURTISS (1971) einen Transportdefekt für Harnsäure in Erythrozyten von Dalmatinern nicht bestätigen. Bei Erythrozyten von Dalmatinern wie Nicht-Dalmatinern hatte die Zugabe von Hypoxanthin keinen Einfluß auf den Harnsäuretransport, im Gegensatz zu Erythrozyten des Menschen, die eine um 80 % geringere Transportrate aufwiesen.

VINAY et al. (1983) fanden keine Unterschiede in der Harnsäure-Transportrate zwischen den Erythrozyten von Dalmatinern und Nicht-Dalmatinern und zwischen den Erythrozyten von Menschen mit und ohne familiärer renaler Hypouricämie. Die Hemmung des Harnsäuretransportes durch Hypoxanthin war bei Erythrozyten des Menschen stärker ausgeprägt, als bei Erythrozyten von Dalmatinern und Nicht-Dalmatinern. Die kompetetive Hemmung des Harnsäure-Transportes durch Hypoxanthin führte die Autoren zu dem Schluß, daß Harnsäure zumindest teilweise mit Hilfe von Carriern transportiert wird.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß man bei 3 Untersuchungen über den Einfluß von Hypoxanthin auf den Harnsäure-Transport in Erythrozyten von Dalmatinern und Nicht-Dalmatinern zu 3 verschiedenen, sich widersprechenden Ergebnissen gelangte: Eine Hemmung des Harnsäure-Transportes in Erythrozyten durch Hypoxanthin fanden HARVEY und CHRISTENSEN (1964) nur beim Nicht-Dalmatiner, DUNCAN und CURTISS (1971) weder beim Dalmatiner noch beim Nicht-Dalmatiner, und schließlich VINAY et al. (1983) bei Dalmatinern und Nicht-Dalmatinern.

Die widersprüchlichen Befunde haben mit großer Wahrscheinlichkeit versuchstechnische Gründe. HARVEY und CHRISTENSEN (1964) führten ihre Untersuchungen an lediglich 2 Dalmatinern durch und verwendeten - ebenso später die anderen 2 Autorengruppen - die Harnsäure in einer Konzentration von 0.1 $mmol \cdot l^{-1}$, zusammen mit einer Hypoxanthinlösung von 1 $mmol \cdot l^{-1}$. Um aber eine zuverlässige Aussage über einen Inhibitionseffekt machen zu können, müssen die verwendeten Substrat- und Inhibitorenkonzentrationen mindestens im Bereich der Michaeliskonstante des Transportes liegen. Die Michaeliskonstante wurde von den oben genannten Autoren nicht untersucht und mußte deshalb unberücksichtigt bleiben.

Ein Beweis für die Hypothese eines generalisierten Transportdefektes beim Dalmatiner wurde somit nicht erbracht.

Über das Harnsäure-Transportsystem in der Leber von Dalmatinern liegen im übrigen noch keine Kenntnisse vor.

1.4. PROBLEMSTELLUNG

Das Transportsystem für Purine beim Hund ist noch nicht erforscht. Die bisher veröffentlichte Literatur über das Harnsäure-Transportsystem beim Hund beschränkt sich auf die Untersuchung der Hemmwirkung von Hypoxanthin auf den Harnsäure-Transport in Erythrozyten von Dalmatinern und Nicht-Dalmatinern. Dies reicht aber nicht aus, um ein Transportsystem in biologischen Membranen zu charakterisieren.

Die 3 bisher durchgeführten Untersuchungen über den Einfluß von Hypoxanthin auf das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Dalmatinern und Nicht-Dalmatinern kamen zu 3 verschiedenen Ergebnissen. Die unzureichend durchgeführten Untersuchungen und die widersprüchlichen Ergebnisse fordern zu einer sorgfältigen,experimentellen Prüfung des Harnsäure-Transportsystems in Erythrozyten von Dalmatinern und Nicht-Dalmatinern auf.

Anhand der kinetischen Größen,der Michaeliskonstante (k_m) und der Maximalgeschwindigkeit (V_{max}), sollen das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Dalmatinern und Beagle charakterisiert, die These eines generalisierten Harnsäure-Transportdefektes beim Dalmatiner überprüft und mögliche rassebedingte Unterschiede erfaßt werden.

Darüberhinaus sollten mögliche Einflüsse einer erhöhten exogenen Purinbelastung auf den Harnsäure-Transport der Erythrozyten untersucht werden. Zu diesem Zwecke erhielten Dalmatiner und Beagle gruppenweise teils eine purinarme Diät auf Caseinbasis, teils eine purinreiche Diät mit einem SCP-Produkt (Single Cell Protein von Methylomonas clara auf Methanol gezüchtet) anstelle des Caseins.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Prinzip der Transportmessung

Für die Untersuchungen des Harnsäure-Transportsystems in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern wurden 2 verschiedene Versuchsanordnungen verwendet:

- Eine sogenannte Zero-Trans-Versuchsanordnung (EILAM u. STEIN, 1874) diente zur Bestimmung der Zeit- und Sättigungskinetik, pH- und Temperaturabhängigkeit, sowie des Einflusses von Inhibitoren auf das Harnsäure-Transportsystem. Dabei wurden der Erythrozytensuspension verschieden konzentrierte, markierte (2-^{14}C)-Harnsäurelösungen zugegeben und der Influx in die von Harnsäure zum Zeitpunkt Null freien Erythrozyten gemessen.

- Eine sogenannte Infinite-Cis-Versuchsanordnung (EILAM u. STEIN, 1974) war für den Nachweis einer beschleunigten Austauschdiffusion erforderlich. Die Erythrozyten wurden mit einer hochkonzentrierten Harnsäurelösung (2-^{14}C) gesättigt. Zum Zeitpunkt Null fügte man verschiedene Konzentrationen unmarkierter Harnsäure dem Außenmedium zu und konnte auf diese Weise den Einfluß des Influx von unmarkierter Harnsäure auf den Efflux markierter Harnsäure bestimmen.

2.2. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die Versuche standen 20 weibliche Hunde der Rasse Dalmatiner und 16 weibliche Hunde der Rasse Beagle zur Verfügung. Die reinrassigen Tiere waren bei Versuchsbeginn durchschnittlich 120 Tage alt. Die Versuche wurden innerhalb von 9 Monaten durchgeführt. Bei den Dalmatinern

handelte es sich um 4 Gruppen von Geschwister-Vierlingen und 2 Gruppen von Geschwister-Zwillingen. Bei den Beagle konnte nach Anlieferung eine Wurfzugehörigkeit nicht mehr festgestellt werden. Jeweils 10 Beagle bzw. 8 Dalmatiner wurden in einem Zwinger mit Freilauf, Zwingerhütte mit Futterautomat, stroheingestreuten Boxen und Wärmequelle (Infrarotlampe) gehalten. Die Tiere wurden zu Versuchsbeginn einer klinischen Einstellungsuntersuchung und danach alle 3 Monate einer klinischen Folgeuntersuchung unterzogen[1]. Sie umfaßte eine allgemeine Routineuntersuchung, sowie die spezielle Untersuchung verschiedener Organsysteme (Herz-Kreislauf mit EKG, Atmung, Verdauung, Lymphsystem; GALLENMÜLLER, 1984).

2.3. Fütterung

Ausgangspunkt für die Zusammensetzung der Futterrationen waren die Casein-Diät und die 100 %-SCP-Diät aus Stoffwechselversuchen an Dalmatinern (GAEBLER et al., 1981). Während der Vorperiode wurde allen Tieren ein pelletiertes Trockenfutter angeboten, das in seiner Zusammensetzung der späteren Kontroll-Diät angeglichen war und als Haupteiweißträger 25 % Casein (Säure-Casein, sprühgetrocknet; Meggle, Reitmehring) enthielt.
Die Versuchs-Diät beinhaltete als Haupteiweißträger 39 % bakterielles Single-Cell-Protein von Methylomonas clara, die auf Methanol gezüchtet wurden (Probion KG 196 bzw. 145; Hoechst/Uhde, Frankfurt) und war wie die Kontroll-Diät auf etwa 25 % verdauliches Protein und einem Bruttoenergiegehalt von etwa 20 000 kJ/kg eingestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Diäten finden sich in Tabelle 1.

---

1) Der Medizinischen Tierklinik der Universität München (Vorstand: Prof. Dr. W. Kraft) wird für die Untersuchungen gedankt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Diäten

Futterbestandteile	SCP-Diät (%)	Casein-Diät (%)
Casein	----	25.00
SCP KP 196/145	39.00	----
Weizenquellmehl	17.30	26.76
Haferflocken	17.00	17.00
Haferschalengries	5.00	5.00
Weizenkeime	2.50	2.50
Grünmehl	2.00	2.00
Blutmehl	2.00	2.00
Tierkörpermehl	1.00	1.00
Rindertalg	2.50	4.00
Fischöl	3.00	3.00
Sojaöl	1.00	1.00
Propylenglykoll	3.00	3.00
DL-Methionin	0.15	0.15
Futterkalk, kohlensauer	3.55	1.20
Futterkalk, phosphorsauer	----	4.58
Kaliumhydrogenphosphat	----	0.78
Viehsalz	0.50	0.53
Magnesiumoxid	0.10	0.10
Vitaminvormischung[a)]	0.20	0.20
Spurenelementenvormischung[b)]	0.20	0.20

a) Die Vitaminvormischung enthält in 2 g (pro kg Alleinfutter):

Retinol	3.0 mg	Cobalamin	20.0 µg
Cholecalciferol	22.0 mg	Biotin	60.0 µg
α-DL-Tocopherolacetat	24.0 mg	Folsäure	120.0 µg
		Ca-Panthothenat	12.0 mg
Menadion	0.8 mg	Nicotinsäure	36.0 mg
Thiamin	3.6 mg	Cholin	300.0 mg
Riboflavin	4.8 mg	Ascorbinsäure	60.0 mg
Pyridoxin	2.0 mg		

b) Die Spurenelementvormischung enthält in 2 g (pro kg Alleinfutter):

Eisenfumarat	200 mg★	Cobaltsulfat ($7\ H_2O$)	2 mg★
Zinkacetat ($2\ H_2O$)	160 mg★	Natriumselenit ($5\ H_2O$)	1 mg★
Mangansulfat ($1\ H_2O$)	160 mg★	Natriumfluorid	10 mg★
Kupferacetat ($1\ H_2O$)	24 mg★	Magnesiumoxid	140 mg★
Kaliumjodid	5 mg★		

★ Mengenangaben (mg) beziehen sich auf die jeweiligen Kationen

Tabelle 2: Gehalt an Nucleinsäuren, Purin- und Pyrimidinderivaten in SCP, SCP- und Casein-Diät

Komponenten		SCP	SCP-Diät	Casein-Diät
RNA	g/kg	82.9	27.0	2.3
CMP	mmol/kg	61	20	1
UMP	mmol/kg	43	14	1
IMP	mmol/kg	2	-	-
GMP	mmol/kg	67	23	2
AMP	mmol/kg	35	11	1
DNA	g/kg	35.7	9.6	0.6
d-CMP	mmol/kg	23	7	7
d-TMP	mmol/kg	23	6	1
d-GMP	mmol/kg	23	7	1
d-AMP	mmol/kg	23	6	1
Nucleoside	g/kg	0.5	2.0	1
Uridin	mmol/kg	2	2	1
Inosin	mmol/kg	-	1	-
Guanosin	mmol/kg	-	2	-
Adenosin	mmol/kg	-	3	-
Basen	g/kg	3.1	0.6	1
Uracil	mmol/kg	3	1	1
Harnsäure	mmol/kg	11	1	-
Hypoxanthin	mmol/kg	3	1	1
Xanthin	mmol/kg	3	1	1

Die Analyse-Daten wurden freundlicherweise von Herrn Dr. W. Tiemeyer zur Verfügung gestellt.

Die Diäten wurden pelletiert (Durchmesser 5 mm) über Futterautomaten angeboten. Die Beagle und Dalmatiner wurden in jeweils zwei gleichgroße Gruppen unterteilt. Eine Gruppe erhielt SCP-Diät, die andere Casein-Diät.

Die Fütterung erfolgte nach einem "Paired Feeding"-System. Dabei wurde den mit SCP-Diät gefütterten Hundegruppen das Futter täglich zur freien Aufnahme angeboten. Nicht verzehrte Futtermengen wurden täglich zur gleichen Zeit zurückgewogen. Die jeweilig korrespondierenden Kontrollgruppen mit Casein-Diät erhielten dann die Verzehrsmenge der SCP-Gruppen der vergangenen 24 Stunden. Konnten bei den Kontrollgruppen Futterreste zurückgewogen werden, so wurde umgekehrt verfahren, indem den SCP-Gruppen die Verzehrsmenge der Kontrollgruppen vorgelegt und die Kontrollgruppe ad libitum gefüttert wurde. Daraus resultierte eine über den gesamten Versuch gleiche Höhe der Futteraufnahme von SCP- und Kontrollgruppen. Wasser stand zur freien Aufnahme zur Verfügung.

2.4. Blutentnahme und Isolierung der Erythrozyten

Blut wurde durch Punktion der V. cephalica dextr. s. sin. gewonnen. Mit Hilfe von Einmalkanülen (Sterikan LIL, 0.9 x 38 mm, 20 G, Braun Melsungen) wurde das Blut in Einmalzentrifugenröhrchen (13 ml, Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen, welche einige Heparinkristalle enthielten. Nach der Markierung des oberen Randes des Blutspiegels im Röhrchen folgte die Zentrifugation bei 2043 g für 10 min (Laborzentrifuge 3E, Sigma. Osterode). Der Plasmaüberstand und der Leukozytensaum wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette, angeschlossen an eine Wasserstrahlpumpe, sorgfältig abgesaugt und das entfernte Volumen durch Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (UMBREIT et al., 1972) ersetzt.

Zusammensetzung des Krebs-Ringer-Phosphatpuffer:

Lösung A:	120 ml	0.77 mmol/l	NaCl
	4.8 ml	0.77 mmol/l	KCl
	3.6 ml	0.55 mmol/l	$CaCl_2$
	1.2 ml	0.77 mmol/l	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$

wurden mit aqua bidest auf 648 ml aufgefüllt.

Lösung B: 0.1 mol/l Phosphatpuffer - 17.8 g $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ wurden mit aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und mit HCl (1 mol/l) auf pH 7.3 eingestellt.

648 ml von Lösung A wurden mit 120 ml der Lösung B vermischt und falls erforderlich der pH-Wert noch einmal auf 7.3 nachkorrigiert. Durch die Zugabe von 300.8 mg Glucose auf 100 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer wurde eine Glucoselösung mit 16.7 mmol/l hergestellt.
Die Erythrozyten wurden vorsichtig im Krebs-Ringer-Phosphatpuffer bei Zimmertemperatur suspendiert, zentrifugiert und der Waschvorgang 2mal wiederholt. Abschließend wurde mit Krebs-Ringer-Phosphatpuffer bis zur Markierung aufgefüllt und diese Suspension für die Versuche verwandt.

2.5. Einfluß des pH und der Temperatur auf die Stabilität der Erythrozytenmembran

Mit Hilfe dieses Vorversuches sollte geklärt werden, bei welchem pH und welcher Temperatur die Stabilität der Erythrozyten-Membran für die Dauer der einzelnen Versuchsabschnitte (maximal 6 Stunden) am besten gewährleistet ist. Erythrozyten von 9 Beagle und 11 Dalmatinern wurden in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer mit verschiedenem pH-Wert suspendiert (pH 7.2, 7.3, 7.4) und bei $4^{o}C$, Zimmertemperatur und $37^{o}C$ gelagert.

Nach 1 Stunde, 6 Stunden und 36 Stunden wurden von den Blutproben Ausstriche angefertigt und mit Trypanblau (Merck, Darmstadt) gefärbt. Nur eine geschädigte Membran nimmt den Farbstoff Trypanblau an. Bei einer Auszählung von 100 Erythrozyten pro Ausstrich kann über den Anteil der blaugefärbten Erythrozyten auf den Prozentsatz der geschädigten Erythrozyten geschlossen werden.

In der für die Durchführung der Versuche erforderlichen Zeitdauer von maximal 6 Stunden war die Erythrozytensuspension bei einem pH von 7.3 des Krebs-Ringer-Phosphatpuffers am stabilsten. Bei pH 7.3 war die Zahl ungefärbter, das heißt intakter Erythrozyten, signifikant höher ($p \leq 0.05$-0.001), als bei pH 7.2 oder 7.4 (s.Tab.3).

Tabelle 3: Ungefärbte Erythrozyten (%) von Beagle (n=9) und Dalmatiner (n=11) nach verschiedenen Zeiten und bei unterschiedlichen Temperaturen in Abhängigkeit vom pH des Krebs-Ringer-Phosphatpuffers

pH-Wert	Lagerungungszeit 1 h			6 h			36 h		
	4°C	20°C	36°C	4°C	20°C	36°C	4°C	20°C	36°C
	Ungefärbte Erythrozyten (%)								
7.2	92.8 ± 5.9	88.5 ± 6.5	85.7 ± 7.5	88.2* ± 6.9	78.2*** ± 9.1	67.0*** ± 13.8	81.4 ± 19.5	67.3* ± 11.1	36.8** ± 11.6
7.3	95.7 ± 3.4	90.3 ± 2.7	87.2 ± 4.3	92.3 ± 2.9	87.4 ± 3.8	79.1 ± 3.8	86.3 ± 6.4	77.7 ± 5.4	49.0 ± 4.1
7.4	91.3 ± 2.7	86.5 ± 3.8	79.2*** ± 5.4	87.5** ± 3.8	80.9** ± 4.5	64.5*** ± 5.6	81.5 ± 4.8	69.7* 8.4	33.6** ± 11.1

Unterschied gegenüber pH 7.3 signifikant mit:

* = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$.

2.6. Bestimmung der Erythrozytenvolumina

Das Erythrozytenvolumen diente als Bezugsgröße für die aufgenommene Harnsäuremenge. Es wurde aus der Differenz des Gesamtwasservolumens (REEVES, 1975) und des extrazellulären Volumens (ROSENBERG et al., 1962) errechnet.

Zur Bestimmung des extrazellulären Volumens wurden 2 ml Erythrozytensuspension (Abschnitt 2.4.) mit 50 µl Inulinlösung (0.02 mmol/l mit Inulin-^{14}C-Carbonsäure, 185 MBq/mmol, Amersham, Braunschweig) 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (2043 g, 10 min) und die Radioaktivität in 100 µl des klaren Überstandes mit 10 ml Scintillator (Quickszint 212, Zinsser, Frankfurt) in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Modell 3385, Packard, Frankfurt) gemessen. Das Gesamtwasservolumen wurde mit $^{3}H_2O$ (185 GBq/ml, Amersham, Braunschweig) nach der gleichen Methode ermittelt.

Die Mittelwerte der Erythrozytenvolumina während der gesamten Versuchsdauer (Tab. 4) stimmten bei Beagle und Dalmatinern nahezu überein. Mit SCP gefütterte Hunde tendierten zu einem etwa 8 % geringeren Erythrozytenvolumen als Hunde mit Casein-Fütterung. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Tabelle 4: Erythrozytenvolumen der Versuchtiere

Gruppe/Behandlung (n)	Stichproben (n)	Erythrozytenvolumen ($ml \cdot l^{-1}$ Suspension)
Beagle-SCP (8)	23	414 ± 82
Beagle-Casein (8)	21	454 ± 69
Dalmatiner-SCP (10)	22	414 ± 65
Dalmatiner-Casein (10)	24	439 ± 74
Beagle (16)	44	430 ± 74
Dalmatiner (20)	45	427 ± 71
Casein-Diät (18)	45	446 ± 70
SCP-Diät (18)	45	414 ± 73

2.7. Untersuchung des Harnsäure-Transportes in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern

Blutproben von 8 - 10 Dalmatinern und 8 - 9 Beagle (jeweils die Hälfte erhielt SCP- bzw. Casein-Diät) wurden entnommen (s. 2.4.) und die Erythrozyten isoliert. Erythrozytensuspension und Inkubationsmedium, bestehend aus Harnsäure mit 2-^{14}C-Harnsäuremarkierung ($11.1 \cdot 10^3$ Bq/ml, Amersham, Braunschweig) in Krebs-Ringer-Phosphatpuffer gelöst, wurden in einem Schüttelwasserbad (Braun Melsungen) bei 50 Schwingungen pro Minute und der jeweils erforderlichen Temperatur vorinkubiert. Durch Zugabe des Inkubationsmediums zur Erythrozytensuspension im Verhältnis 1 : 1 wurde die Aufnahme der Harnsäure in die Erythrozyten gestartet (Zeitpunkt Null). Am Ende der Inkubationszeiten wurden Erythrozyten und Inkubationsmedium mit Hilfe einer Zentrifugations-Filtrations-Technik (KLINGENBERG u. PFAFF, 1967) schnell getrennt und so die Harnsäureaufnahme gestoppt.
Hierfür wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) 200 µl Perchlorsäure (1 mmol/l) mit 300 µl Silikonöl (AR 200, Wacker-Chemie, München) überschichtet. 100 µl der Erythrozytensuspension wurden am Ende der Inkubation vorsichtig auf die Silikonschicht pipettiert und die Erythrozyten schnell durch die Silikonschicht in die Perchlorsäureschicht zentrifugiert (8000 g, 30 sec, Zentrifuge 3200, Eppendorf, Hamburg). Danach wurden Inkubationsmedium und Silikonschicht sorgfältig abgesaugt und die Radioaktivität in 100 µl der Perchlorsäureschicht mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen.

Da bei dieser Methode immer auch etwas Medium durch die Silikonschicht gezogen wird, muß dieses extrazelluläre Volumen bestimmt werden und die gemessene Radioaktivität mit der extrazellulären Substratradioaktivität korrigiert werden. Hierzu wurde einer Erythrozytensuspension

Inulinlösung (0.02 mmol/l mit Inulin-^{14}C-Carbonsäure, 185 MBq/mmol, Amersham, Braunschweig) zugesetzt, die Erythrozyten mit Hilfe der Zentrifugations-Filtrations-Technik abgetrennt und das extrazelluläre Volumen über die Messung der Radioaktivität in der Perchlorsäure bestimmt.

2.7.1. Abhängigkeit der Harnsäureaufnahme von der Zeit, Anfangskonzentration, Temperatur und vom pH-Wert

1 ml der Erythrozytensuspension und 1 ml markierte Harnsäurelösung (7.68 mmol/l) wurden bei 37°C inkubiert, der Transport nach verschiedenen Zeiten gestoppt (1, 2, 3, 5, 7, 9, 14, 20, 30, 40 min) und der Verlauf ermittelt. Der Kurvenverlauf in der Abbildung 1 und 2 ist geschätzt.

1 ml Erythrozytensuspension wurde bei 37°C mit 1 ml Harnsäuremedium von unterschiedlicher Konzentration (0.96 - 17.2 mmol Harnsäure/l) inkubiert und die Harnsäureaufnahme in die Erythrozyten nach 2 und 5 min gestoppt.

2 ml der Erythrozytensuspension und 2 ml markierte Harnsäurelösung (0.5 mmol/l) wurden bei 5, 17, 27 und 37°C inkubiert und der Transport nach 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 20 min gestoppt und die Harnsäuretransportrate bestimmt.

Jede Blutprobe wurde aufgeteilt und die Erythrozyten mit Puffern unterschiedlicher pH-Werte (pH 6.3 - pH 7.5) isoliert. Je 1 ml der Erythrozytensuspension wurde mit 1 ml markiertem Harnsäuremedium (3.4 mmol/l mit entsprechendem pH-Wert) bei 37°C inkubiert und die Aufnahme der Harnsäure in die Erythrozyten nach 2 und 5 min gestoppt.

2.7.2. Inhibition der Harnsäureaufnahme

300 µl der Erythrozytensuspension wurden mit 300 µl einer der nachfolgend aufgeführten Lösungen versetzt und der Transport durch die Zugabe von 300 µl einer Harnsäurelösung von 4 mmol/l bei einer Inkubationstemperatur von 37°C gestartet. Nach 2 und 5 min wurde die Harnsäureaufnahme gestoppt und gemessen. Folgende Inhibitorlösungen wurden dem Inkubationsmedium zugesetzt:

1. Uridin	15 mmol/l
2. Uracil	15 mmol/l
3. Adenin	15 mmol/l
4. Adenosin	15 mmol/l
5. Hypoxanthin	15 mmol/l
6. Na-Salicylat	10 mmol/l
7. Na-Benzoat	10 mmol/l

Die Auswahl der Inhibitoren und der Konzentrationen orientierte sich an den Untersuchungen von LASSEN und OVERGAARD-HANSEN (1962 a,b) sowie LUCAS-HERON und FONTENAILLE (1979).
Um den Einfluß der Glykolyse auf den Harnsäure-Transport in die Erythrozyten zu untersuchen, wurden darüberhinaus zwei Versuche durchgeführt:

- Im ersten Versuch wurde die Aufnahme von Harnsäure in Abwesenheit von Glucose im Krebs-Ringer-Phosphatpuffer untersucht;

- im zweiten Versuch wurde dem Krebs-Ringer-Phosphatpuffer der Glykolysehemmer Na-Fluorid (40 mmol/l) zugesetzt.

2.7.3. Nachweis der Beschleunigten Austauschdiffusion

5 ml der Erythrozytensuspension wurden mit 5 ml markierter Harnsäurelösung (17.0 mmol/l) für 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung auf 4°C wurden die Erythrozyten bei dieser Temperatur mit Krebs-Ringer-Phosphatpuffer (4°C) gewaschen und auf das Anfangsvolumen aufgefüllt. Jeweils 0.5 ml der Erythrozytensuspension wurde mit 0.5 ml unmarkiertem Harnsäuremedium mit unterschiedlicher Konzentration (1.9 - 11.2 mmol/l) inkubiert. Die Aufnahme der Harnsäure wurde nach 2 und 5 min gestoppt und die Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt.

2.8. Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der markierten Harnsäurelösung

Die Harnsäurekonzentrationen in den Inkubationsmedien und die Reinheit der ^{14}C-Harnsäure wurde mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) überprüft (TIEMEYER et al., 1981). Das HPLC-System (Waters Associates, Königstein/Ts.) bestand aus einem Pumpensystem (Modell 6000 A), einem Injektor (Modell U6-K) und einem UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (Modell 450).

Zur Bestimmung der Harnsäurekonzentration wurden 10 µl Inkubationsmedium auf eine reversed-phase (Länge 300 mm; Durchmesser 4 mm, µ-Bondapak C 18, Waters, Königstein/Ts.; Elutionsmittel 0.01 mol/l $NH_4H_2PO_4$, pH 5.0) aufgegeben. Die Flußrate betrug 1.0 ml/min, die Harnsäure wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Die Harnsäurekonzentration wurde durch Integration (Integrator Modell 3380 A, Hewlett-Packard, Böblingen) der Peakflächen und mit Hilfe eines Harnsäurestandards (Sigma, München) bestimmt. Zur Überprüfung der radioaktiven Harnsäure wurden 100 µl Harnsäurelösung auf die Säule gegeben, die

dem Harnsäure-Peak entsprechende Fraktion aufgefangen, die Radioaktivität im Flüssig-Szintillationszähler gemessen und mit der Radioaktivität der Ausgangslösung verglichen.

2.9. Berechnung der kinetischen Größen

Kinetische Konstanten von Carrier-Transportsystemen (Michaelis-Konstante (K_m) und maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max})) wurden aus der Steigung verschiedener, linearisierter Darstellungen der Michaelis-Menten-Gleichung durch Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Quadrate errechnet. Bei der Auftragung des Quotienten aus Substratkonzentration und Transportgeschwindigkeit (S/v) gegen die Substratkonzentration (S) resultiert eine Gerade, deren Steigung dem reziproken Wert der maximalen Transportgeschwindigkeit (V_{max}) entspricht, während im Diagramm v gegen v/(S) die negative Steigung zahlenmäßig den reziproken Wert der Michaelis-Konstante (K_m) darstellt. Die Michaelis-Konstante und die maximale Transportgeschwindigkeit wurden berechnet aus:

1) $v/(S) = V_{max}/K_m - v/K_m$ nach HOFSTEE (HOFSTEE, 1959)

2) $(S)/V = (S)/V_{max} \times (S) + K /V_{max}$ nach EADIE-HOFSTEE (WILKINSON ,1961)

Die Berechnungen wurden auf einer Rechenanlage (Commodore, cbm 3032, Schulz, München) durchgeführt.+

+ Herrn Priv. Doz. Dr. F. Ungemach, Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät (kom. Vorstand Prof. Dr. W. Leidl) wird für seine Beratung gedankt.

2. 10. Statistische Methoden

Die Ergebnisse werden als Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm SD$) angegeben. Unterschiede zwischen Stichproben von den gleichen Tieren bei unterschiedlicher Behandlung wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für Paardifferenzen, Unterschiede zwischen Stichproben der verschiedenen Rasse- und Fütterungsgruppen wurden mit Hilfe des U-Tests von Wilcoxon, Mann und Whitney (SACHS, 1972) auf Zufallswahrscheinlichkeit geprüft.

3. ERGEBNISSE

Erythrozytensuspensionen von 9 Dalmatinern und 9 Beagle wurden zur Bestimmung der Zeit- und Sättigungskinetik, pH- und Temperaturabhängigkeit, sowie des Inhibitoreneinflusses auf das Harnsäure-Transportsystem mit markierter Harnsäurelösung versetzt und die Harnsäureaufnahme in den gewünschten Zeitabständen bestimmt. Falls nicht gesondert vermerkt, betrug die Inkubationstemperatur 37°C und der pH 7.3.

3.1. Zeitabhängigkeit der Harnsäureaufnahme

Abbildung 1 und 2 sowie Tabelle 5 zeigen, daß die Harnsäureaufnahme der Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern aus 2 unterschiedlichen Komponenten besteht, einer schnellen und einer langsamen, die nach 2 bzw. nach etwa 40 Minuten gesättigt sind. Dabei wird eine Harnsäure-Endkonzentration in den Erythrozyten von 5.0 $mmol \cdot l^{-1}$ erreicht, die um etwa 1.4 $mmol \cdot l^{-1}$ über der extrazellulären Gleichgewichtskonzentration von 3.6 $mmol \cdot l^{-1}$ liegt (Abb. 1, 2).

Die schnelle Komponente der Harnsäure-Aufnahme ist schon nach den ersten 2 Minuten gesättigt, bevor ein Konzentraionsausgleich zwischen Erythrozyten und extrazellulärem Raum erreicht ist. Die nach den ersten 2 Minuten gemessene Harnsäurekonzentration stimmt andererseits überein mit der Differenz zwischen Endkonzentration in den Erythrozyten und der Gleichgewichtskonzentration im extrazellulären Raum. Dies weist darauf hin, daß es sich bei der schnellen Komponente um eine Adsorption von Harnsäure auf der Oberfläche der Erythrozyten handeln könnte. Somit würde nur die langsame Komponente der Harn-

säure-Aufnahme den Transport durch die Erythrozytenmembran widerspiegeln.

Subtrahiert man die in den ersten 2 Minuten gemessene Harnsäuremenge von den gefundenen Werten, so erreicht die Harnsäure-Aufnahme nach 40 Minuten die Gleichgewichtskonzentration, überschreitet sie aber nicht. Dieses Verhalten spricht für Diffusion oder erleichterte Diffusion. Ein Transport von Harnsäure gegen ein Konzentrationsgefälle, das heißt ein aktiver Transport, findet nicht statt.

Die Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern zeigen keinen unterschiedlichen Verlauf in der Harnsäure-Aufnahme (Abb. 1; geschätzter Kurvenverlauf). Die schnelle Komponente der Harnsäure-Aufnahme ist bei den mit Casein und mit SCP gefütterten Tieren gleich. Die langsame Komponente weist bei Erythrozyten der Caseingruppe eine deutlich höhere Harnsäure-Aufnahme auf, als bei Erythrozyten von SCP-Tieren (Abb. 2; geschätzter Kurvenverlauf). Bei 5 und 8 Minuten ist der Unterschied mit $p \leq 0.005$ signifikant (Tab. 5).

Tabelle 5: Zeitabhängigkeit der Harnsäure-Aufnahme bei Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner; Harnsäure-Konzentration 5.1 $mmol \cdot l^{-1}$

Zeit (min)	Beagle (n=9)	Dalmatiner (n=9)	SCP-Fütterung (n=8)	Casein-Fütterung (n=10)
	Harnsäurekonzentration in den Erythrozyten ($mmol \cdot l^{-1}$)			
1	0.86 ± 0.27	0.84 ± 0.17	0.95 ± 0.19	0.78 ± 0.22
2	1.52 ± 0.39	1.60 ± 0.41	1.33 ± 0.34	1.44 ± 0.43
3	1.51 ± 0.30	1.60 ± 0.49	1.38 ± 0.30	1.70 ± 0.42
4	1.63 ± 0.31	1.70 ± 0.33	1.56 ± 0.29	1.76 ± 0.32
5	1.87 ± 0.51	2.05 ± 0.62	1.58 ± 0.24	2.24[a] ± 0.55
8	2.31 ± 0.42	2.36 ± 0.51	2.05 ± 0.26	2.59[a] ± 0.46
14	2.71 ± 0.61	2.95 ± 0.99	2.57 ± 0.67	3.04 ± 0.89
20	3.31 ± 0.94	3.44 ± 0.67	3.12 ± 0.39	3.58 ± 0.98
30	4.85 ± 0.38	4.57 ± 0.95	4.31 ± 0.58	4.79 ± 0.75
40	5.04 ± 0.51	4.89 ± 0.69	4.73 ± 0.51	5.18 ± 0.52

a) Unterschied gegenüber SCP-Fütterung signifikant mit $p \leq 0.005$

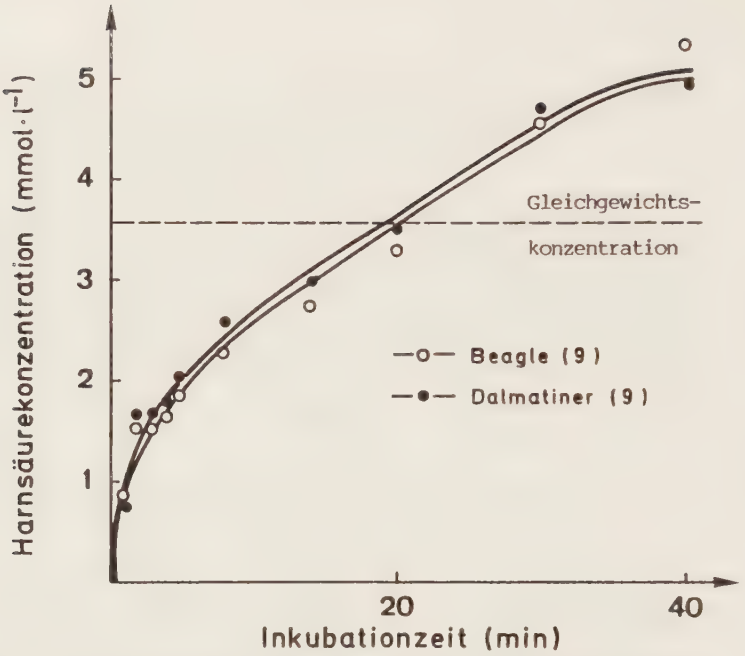

Abbildung 1: Harnsäurekonzentration in den Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit (vgl. Tab. 5)

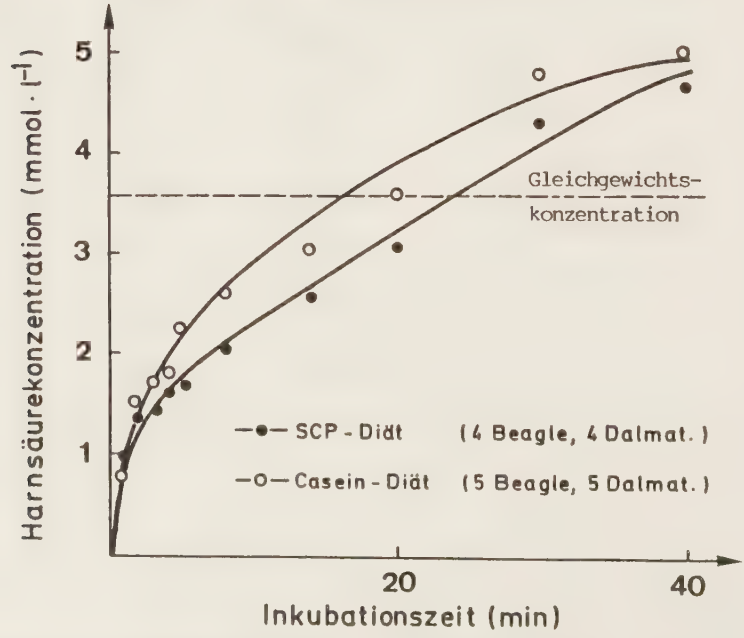

Abbildung 2: Harnsäurekonzentration in den Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit (vgl. Tab. 5)

3.2. Abhängigkeit der Harnsäure-Aufnahme von der Inkubationskonzentration

Um zwischen einfacher Diffusion und erleichterter Diffusion zu unterscheiden, wurden die Erythrozyten mit verschiedenen Harnsäurekonzentrationen inkubiert. Erfolgt die Aufnahme durch einfache Diffusion, so steigt die Harnsäurekonzentration in den Erythrozyten proportional mit der Erhöhung der Inkubationskonzentration an. Bei erleichterter Diffusion zeigt sie jedoch Sättigungskinetik.

Die langsame Komponente der Harnsäure-Aufnahme zeigt in Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner Sättigungskinetik (Tab. 6, Abb. 3 u. 4, mit geschätztem Kurvenverlauf). Dies weist darauf hin, daß der langsamen Komponente der Harnsäure-Aufnahme eine erleichterte Diffusion zugrunde liegt. Somit ist es erlaubt, den Harnsäure-Tansport mit Hilfe der Michaelis-Menten Kinetik zu beschreiben und zwar durch die Berechnung der Michaelis-Konstante (K_m) und der maximalen Transportgeschwindigkeit (V_{max}) aus der Transformation der üblichen Michaelis-Menten-Gleichung in ihre linearen Formen (s. Abschnitt 2.9.). K_m und V_{max}, die nach zwei verschiedenen Transformationen berechnet wurden, stimmen in ihren Ergebnissen überein. Die hohe K_m bei SCP-Fütterung (Tab. 7) bedeutet, daß das Transportsystem eine geringe Affinität zur Harnsäure besitzt, da erst bei einer sehr hohen Harnsäurekonzentration die halbmaximale Transportgeschwindigkeit erreicht wird.

Für Beagle und Dalmatiner wurden keine Unterschiede in der K_m und V_{max} gefunden (Abb. 3). Differenziert man jedoch nach der Fütterung, so erkennt man eine signifikant höhere K_m (Faktor ca. 2.5; $p \leq 0.01$) und eine signifikant höhere V_{max} (Faktor 1.7; $p \leq 0.01$) in Erythrozyten von SCP-gefütterten Hunden im Vergleich zu Casein-

Tabelle 6: Transportrate der Harnsäure in Erythrozyten in Abhängigkeit von der Inkubationskonzentration

Gruppe/Behandlung (n)	Harnsäure-Inkubationskonzentration ($mmol \cdot l^{-1}$)								
	0.61	1.20	2.40	3.60	5.10	5.80	7.20	9.00	10.50
	Harnsäure-Transportrate ($\mu mol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$)								
Beagle (9)	41.8 ± 14.4	75.6 ± 26.5	111.3 ± 29.0	140.8 ± 19.4	172.9 ± 16.4	176.0 ± 70.1	193.0 ± 39.9	213.4 ± 55.8	239.8 ± 86.5
Dalmatiner (9)	32.5 ± 10.2	57.6 ± 18.9	100.0 ± 31.6	130.8 ± 18.0	170.3 ± 32.0	171.9 ± 34.2	194.0 ± 29.6	210.5 ± 51.3	227.8 ± 54.9
SCP-Fütterung (8)	22.8 ± 2.7	49.2 ± 13.2	86.5 ± 28.9	134.7 ± 19.1	162.8 ± 26.1	177.3 ± 53.9	230.5 ± 10.6	212.8 ± 54.7	250.5 ± 90.6
	***	*	*				***		
Casein-Fütterung (10)	44.1 ± 8.6	74.4 ± 23.8	117.4 ± 24.6	139.7 ± 20.6	179.3 ± 22.8	170.3 ± 40.2	180.8 ± 31.7	211.0 ± 52.4	219.8 ± 46.0

Unterschied zwischen SCP- und Casein-Fütterung signifikant mit: * = $p = 0.05$; *** = $p = 0.001$.

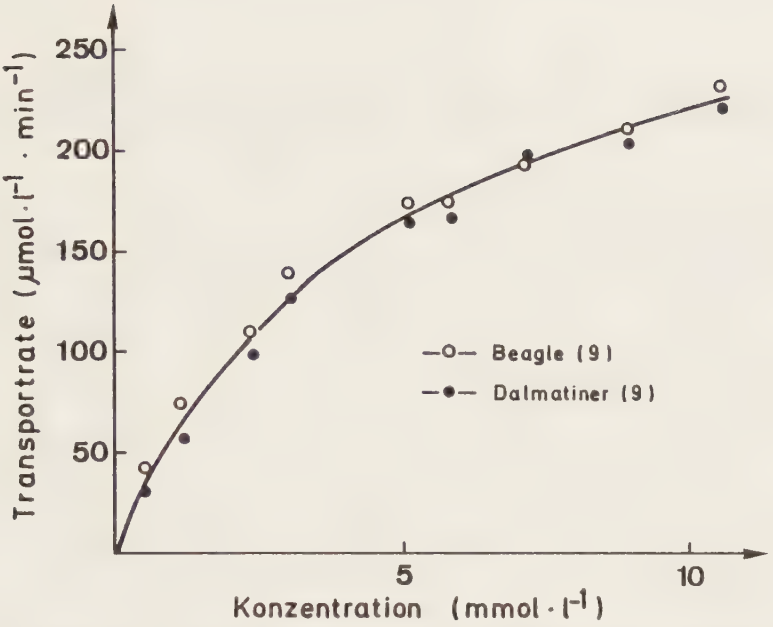

Abbildung 3: Harnsäure-Transportrate in Erythrozyten bei verschiedenen Harnsäure-Konzentrationen (vgl. Tab. 6)

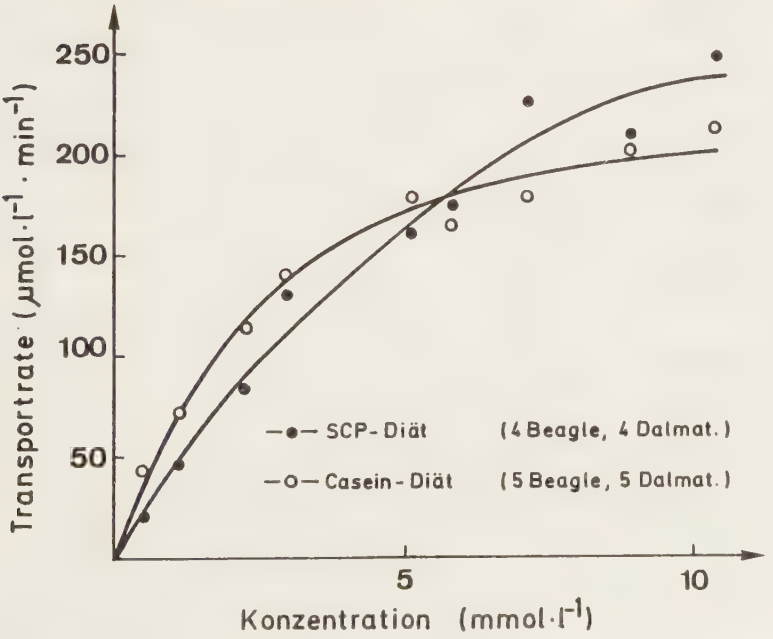

Abbildung 4: Harnsäure-Transportrate in Erythrozyten bei verschiedenen Harnsäure-Konzentrationen (vgl. Tab. 6)

Tabelle 7: Michaelis-Konstante (K_m) und maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) des Harnsäure-Transportsystems in Erythrozyten

Gruppe/Behandlung (n)	Berechnung nach Hofstee		Berechnung nach Eadie-Hofstee	
	K_m (a)	V_{max} (b)	K_m (a)	V_{max} (b)
Beagle:				
SCP-Diät (4)	11.5 ± 2.6	603 ± 146	11.6 ± 2.3	584 ± 126
Casein-Diät (5)	3.5 ± 2.9	268 ± 108	3.1 ± 2.7	256 ± 98
Dalmatiner:				
SCP-Diät (4)	8.7 ± 4.3	391 ± 181	8.6 ± 4.0	384 ± 173
Casein-Diät (4)	4.5 ± 1.2	331 ± 52	4.3 ± 1.8	324 ± 70
Beagle (9)	6.6 ± 4.7	402 ± 201	7.0 ± 4.9	417 ± 212
Dalmatiner (8)	6.4 ± 3.6	354 ± 126	6.6 ± 3.7	361 ± 127
SCP-Diät (8)	9.8 ± 3.3	484 ± 176	10.1 ± 3.6	497 ± 190
Casein-Diät (9)	** 3.7 ± 2.3	** 286 ± 86	** 3.9 ± 2.3	** 296 ± 89

a) ($mmol \cdot l^{-1}$); b) ($/umol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$)

Unterschied zwischen SCP- und Casein-Diät signifikant mit:
** = $p \leq 0.01$

gefütterten Tieren (Tab. 7). Zu diesen Unterschieden tragen sowohl Beagle wie auch Dalmatiner mit SCP-Fütterung bei.

Die in den ersten 2 Minuten aufgenommene Harnsäure erhöht sich mit steigender Harnsäurekonzentration im Medium und erreicht bei einer extrazellulären Harnsäurekonzentration von etwa 9 $mmol \cdot l^{-1}$ einen Maximalwert von etwa 3 $mmol \cdot l^{-1}$ Erythrozytenvolumen (Tab. 8).
Unter der Annahme einer Adsorption von Harnsäure auf der Erythrozytenoberfläche würde dieser Wert die maximale Harnsäurebelegung darstellen. Bei sehr hohen Harnsäurekonzentrationen (9.o - 10.5 $mmol \cdot l^{-1}$) tendierte die schnelle Komponente der Harnsäureaufnahme bei Erythrozyten von Dalmatinern zu höheren Harnsäurekonzentrationen als bei Beagle und war bei 10.5 $mmol \cdot l^{-1}$ auch statistisch signifikant ($p \leq 0.05$).
Die Fütterung mit SCP und Casein beeinflusste die schnelle Komponente der Harnsäureaufnahme nicht.

Tabelle 8: Harnsäure-Aufnahme von Erythrozyten in den ersten 2 Minuten bei verschiedenen Inkubationskonzentrationen

Gruppe/Behandlung (n)	Harnsäure-Inkubationskonzentration ($mmol \cdot l^{-1}$)								
	0.61	1.20	2.40	3.60	5.10	5.80	7.20	9.00	10.50
	Harnsäurekonzentration ($mmol \cdot l^{-1}$)								
Beagle (9)	0.26 ± 0.07	0.48 ± 0.18	0.77 ± 0.19	1.38 ± 0.27	1.85 ± 0.28	1.93 ± 0.62	2.52 ± 0.54	2.85 ± 0.70	2.86 ± 0.96 *
Dalmatiner (9)	0.27 ± 0.07	0.46 ± 0.16	0.96 ± 0.36	1.62 ± 0.36	1.92 ± 0.53	2.02 ± 0.38	2.41 ± 0.80	3.33 ± 0.52	3.58 ± 0.47
SCP-Fütterung (8)	0.25 ± 0.08	0.43 ± 0.13	0.86 ± 0.20	1.25 ± 0.13	1.75 ± 0.33	1.64 ± 0.44	2.63 ± 0.33	2.62 ± 0.36	3.39 ± 0.49
Casein-Fütterung (10)	0.27 ± 0.07	0.50 ± 0.19	0.86 ± 0.36	1.72 ± 0.46	2.05 ± 0.28	2.28 ± 0.78	2.58 ± 0.61	3.56 ± 0.91	3.17 ± 0.77

Unterschied zwischen Dalmatiner und Beagle signifikant mit: * = $p = 0.05$

3.3. Temperaturabhängigkeit der Harnsäure-Aufnahme

Falls der Transport von Harnsäure in die Erythrozyten carrierabhängig ist, muß die Temperatur einen starken Einfluß auf die Transportgeschwindigkeit ausüben.

Tabelle 9 zeigt die Aufnahme der Harnsäure in Abhängigkeit von der Zeit bei verschiedenen Temperaturen für alle Hunde (9 Beagle, 9 Dalmatiner). Die Kurven für die einzelnen Rasse- und Fütterungsgruppen zeigen das gleiche Bild. Die schnelle Komponente, das heißt die Harnsäure-Aufnahme in den ersten 2 Minuten, wird von der Temperatur nicht signifikant beeinflußt (Tab.9; Abb. 5). Dies unterstützt die Annahme, daß es sich dabei um eine Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran handelt.
Einen großen Einfluß übt dagegen die Temperatur auf die langsame Komponente, das heißt den tatsächlichen Transport in die Erythrozyten, aus. Bis 17°C findet kein Transport in die Erythrozyten statt, während er sich bei einer Temperaturerhöhung von 27°C auf 37°C mehr als verdoppelt. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß es sich bei der langsamen Komponente der Harnsäure-Aufnahme um einen carrierabhängigen Transport handelt.
Aus dem Anstieg der Transportrate zwischen 27°C und 37°C läßt sich der Temperaturkoeffizient Q_{10}:

$$\log Q_{10} = 10/T_2 - T_1 \cdot \log k_2/k_1$$

und über die Arrhenius-Gleichung ($\ln k = E_a/R \cdot T + \text{const.}$) die Aktivierungsenergie E_a:

$$E_a = 2.303 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2/(T_1-T_2) \cdot \log k_2/k_1$$

bestimmen. Dabei ist k die Geschwindigkeitskonstante, R die allgemeine Gaskonstante, T die absolute Temperatur (HAWKINS u. BERLIN, 1969). Bei der Temperaturabhängigkeit der langsamen Komponente der Harnsäure-Aufnahme gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren (Tab. 10).

Tabelle 9: Harnsäure-Aufnahme der Erythrozyten in Abhängigkeit von der Temperatur[a)]
Inkubationskonzentration 0.31 mmol·l^{-1}

Zeit (min)	Inkubationstemperatur (°C) 5	17	27	37
	Harnsäure (mol·l^{-1} Erythrozytenvolumen)			
1	56.0 ± 15	54.1 ± 17	66.1 ± 23	69.0 ± 13
2	54.3 ± 17	52.9 ± 35	62.0 ± 19	74.0 ± 26
3	70.0 ± 32	38.8 ± 21	81.5 ± 33	80.5 ± 38
4	53.0 ± 17	42.4 ± 10	69.0 ± 24	82.7 ± 47
6	48.2 ± 27	53.1 ± 26	60.3 ± 33	125.8 ± 50
8	49.0 ± 25	50.0 ± 24	77.9 ± 38	113.5 ± 49
10	54.6 ± 31	37.3 ± 13	87.3 ± 40	128.0 ± 48
14	57.3 ± 15	36.4 ± 19	104.3 ± 43	177.3 ± 67
18	55.9 ± 28	55.0 ± 38	129.5 ± 55	196.4 ± 64
20	40.6 ± 20	52.5 ± 24	132.6 ± 48	226.9 ± 94

a) Erythrozyten von 9 Beagle und 9 Dalmatinern

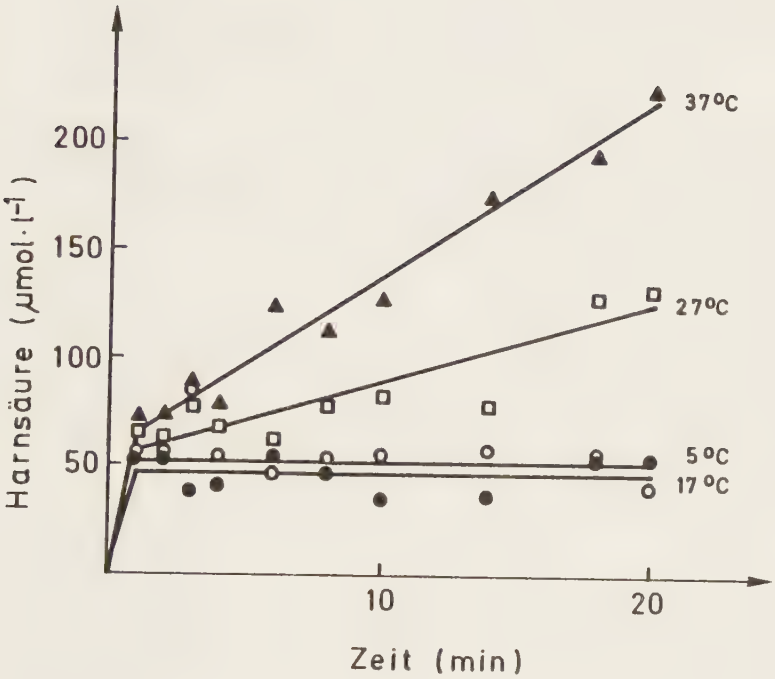

Abbildung 5: Harnsäure-Aufnahme in Erythrozyten bei verschiedenen Temperaturen; pH 7.27 (vgl. Tab. 9)

Tabelle 10: Temperaturquotient Q_{10} und Aktivierungsenergie E_a des Harnsäuretransportes bei Temperatur-Erhöhung von 27°C auf 37°C Inkubationskonzentration 0.31 mmol·l^{-1}

Gruppe/Behandlung (n)	Temperaturquotient[a] Q_{10}	Aktivierungsenergie[b] E_a (KJ · mol^{-1})
Beagle (8)	2.3 ± 0.6	64.48 ± 27.10
Dalmatiner (9)	2.8 ± 1.1	70.75 ± 32.10
SCP-Diät (8)	2.6 ± 1.0	64.58 ± 30.89
Casein-Diät (9)	2.5 ± 0.9	64.39 ± 26.46

a) $$Q_{10} = \frac{\text{Transportkonstante } k_2 \ (37^\circ C)}{\text{Transportkonstante } k_1 \ (27^\circ C)}$$

b) $$E_a = \frac{2.3 \cdot R \cdot T_1 \cdot T_2}{(T_2 - T_1)} \cdot \log \frac{k_2}{k_1}$$

3.4. Einfluß von Inhibitoren auf die Harnsäure-Aufnahme von Erythrozyten

Die erleichterte Diffusion läßt sich durch Verbindungen ähnlicher Struktur hemmen. Als Inhibitoren wurden Purin- und Pyrimidinderivate gewählt. Zusätzlich wurde der Einfluß von Inhibitoren des Anionentransportsystems und der intraerythrozytären Glykolyse auf die Aufnahme von Harnsäure untersucht.

Purin- und Pyrimidinderivate, sowie Anionentransportinhibitoren hemmen die langsame Komponente der Harnsäure-Aufnahme signifikant ($p \leq 0.05 - 0.01$; Tab. 11 u. 12). Dies läßt auf ein sehr unspezifisches Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten der beiden Hunderassen schließen.

Der Versuch zum Einfluß der Glykolyse wurde durch die Eliminierung der intraerythrozytären Glykolyse durch Inkubation ohne Glucosezusatz im Medium und durch die Hemmung der Glykolyse mit dem Enolasehemmer Na-Fluorid untersucht. Tabelle 12 zeigt, daß die Harnsäure-Transportrate in die Erythrozyten um nahezu die Hälfte herabgesetzt wird.

Die Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran wird durch die Zugabe von Purin- und Pyrimidinderivaten, Anionentransportinhibitoren und die Hemmung der Glykolyse deutlich gehemmt (Tab. 13 u. 14).

Die hohen Standardabweichungen der Harnsäure-Transportraten (Ta. 11 u. 12) gegenüber der Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran (Tab. 13 u. 14) hängen damit zusammen, daß die Adsorption gegenüber der Transportrate im Sättigungsbereich gemessen wurde und deshalb geringeren Schwankungen unterworfen ist.

Tabelle 11: Harnsäure-Transportrate in Erythrozyten nach Zugabe von Inhibitoren
Harnsäure-Inkubationskonzentration 1.74 mmol·l^{-1}

Gruppe/Behandlung (n)	Inhibitoren					
	ohne Inhibitor	Uracil	Uridin	Adenin	Adenosin	Hypoxanthin
	Harnsäure-Transportrate (µmol·l^{-1})					
Beagle (9)	86.2 ± 42	33.0*** ± 22	48.9** ± 29	39.2* ± 21	45.1* ± 33	34.0** ± 22
Dalmatiner (8)	79.1 ± 45	36.0* ± 27	41.1* ± 36	52.8 ± 21	40.2* ± 31	47.8* ± 34
SCP-Fütterung (9)	69.7 ± 47	25.5* ± 20	44.6* ± 31	45.4 ± 22	34.2* ± 18	35.6* ± 30
Casein-Fütterung (8)	98.8 ± 34	46.8*** ± 24	45.3** ± 35	57.7** ± 27	53.1** ± 26	48.4** ± 21

Hemmung im Vergleich zu Standard ohne Inhibitor signifikant mit: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$
*** = $p < 0.001$.

Tabelle 12: Harnsäure-Transportrate in Erythrozyten nach Zugabe von Inhibitoren
Harnsäure-Inkubationskonzentration 1.74 mmol·l^{-1}

Gruppe/Behandlung (n)	Inhibitoren				
	ohne Inhibitor	Na-Benzoat	Na-Salicylat	ohne Glucose	Na-Fluorid
	Harnsäure-Transportrate (μmol·l^{-1}·min^{-1})				
Beagle (9)	86.5 ± 42	59.8* ± 25	38.4* ± 38	42.4* ± 21	34.3* ± 22
Dalmatiner (8)	86.9 ± 41	43.5* ± 13	51.0* ± 44	38.0** ± 34	41.6** ± 30
SCP-Fütterung (9)	75.6 ± 46.8	49.6* ± 22	40.8* ± 43	43.7* ± 29	28.4* ± 24
Casein-Fütterung (8)	98.8 ± 34	54.2** ± 21	51.6* ± 39	36.5*** ± 32	47.4*** ± 24

Hemmung im Vergleich zu Standard ohne Inhibitor signifikant mit: * = p=0.05; ** = p=0.01; *** = p=0.001.

Tabelle 13: Harnsäure-Aufnahme in den ersten 2 Minuten nach der Zugabe von Inhibitoren
Harnsäurekonzentration 1.74 mmol·l^{-1}; Inkubationstemperatur 37°C

Gruppe/Behandlung (n)	Inhibitoren					
	ohne Inhibitor	Uracil	Uridin	Adenin	Adenosin	Hypoxanthin
	Harnsäure-Aufnahme (mmol·l^{-1})					
Beagle (9)	1483.2 ± 309	348*** ± 95	333*** ± 113	314*** ± 195	436*** ± 116	370*** ± 139
Dalmatiner (9)	1339.6 ± 218	284*** ± 102	513*** ± 160	339*** ± 137	497*** ± 182	411*** ± 176
SCP-Fütterung (10)	1371.7 ± 302	356*** ± 104	434*** ± 198	358*** ± 191	492*** ± 165	415*** ± 177
Casein-Fütterung (8)	1461,0 ± 231	276*** ± 118	409*** ± 118	287*** ± 123	435*** ± 137	360*** ± 127

Abfall im Vergleich zur Inkubationslösung ohne Inhibitor signifikant: *** = p<0.001.

Tabelle 14: Harnsäure-Aufnahme in den ersten 2 Minuten nach der Zugabe von Inhibitoren
Harnsäurekonzentration 1.74 $mmol \cdot l^{-1}$; Inkubationstemperatur 37°C

Gruppe/Behandlung (n)	Inhibitoren				
	ohne Inhibitor	Na-Benzoat	Na-Salicylat	ohne Glucose	Na-Fluorid
	Harnsäure-Aufnahme ($mmol \cdot l^{-1}$)				
Beagle (9)	1483.3 ± 308	319.9*** ± 151	557.5*** ± 156	800.1*** ± 343	1099.7* ± 351
Dalmatiner (9)	1339.6 ± 218	304.3*** ± 132	636.0** ± 154	858.0*** ± 204	960.2** ± 214
SCP-Fütterung (107	1371.7 ± 302	351.1*** ± 145	557.6*** ± 168	741.7*** ± 208	969.2** ± 323
Casein-Fütterung (8)	1461.0 ± 232	263.4*** ± 118	658.3*** ± 121	938.6** ± 321	1105.9* ± 243

Hemmung im Vergleich zu Standard ohne Inhibitor signifikant mit: * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$ *** = $p \leq 0.001$.

3.5. Einfluß des pH-Wertes auf die Harnsäure-Aufnahme von Erythrozyten

Tabelle 15 und die Abbildungen 6 und 7 zeigen die pH-Abhängigkeit der langsamen Komponente der Harnsäure-Aufnahme von Erythrozyten, die den tatsächlichen Harnsäuretransport in Erythrozyten repräsentiert. Zwischen pH 6.3 und pH 6.6 steigt der Harnsäure-Transport in Erythrozyten an und erreicht zwischen pH 6.6 und pH 6.9 seinen Maximalwert und fällt bis pH 7.5 allmählich wieder ab. Beagle und Dalmatiner, sowie die Fütterungsgruppen SCP und Casein unterscheiden sich nicht signifikant.

Die schnelle Komponente der Harnsäure-Aufnahme, das heißt die Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran, steigt von pH 6.3 bis zu pH 7.5 an (Tab. 16). Während Dalmatiner bei pH 6.9 ($p < 0.01$), pH 7.2 ($p < 0.01$) und pH 7.5 ($p < 0.001$) signifikant mehr Harnsäure an die Erythrozytenmembran adsorbieren als Beagle-Hunde, weisen SCP und Casein gefütterte Hunde keine signifikanten Unterschiede auf (Abb. 8 u. 9).

Tabelle 15: Harnsäure-Transportrate bei steigenden pH-Werten
Harnsäurekonzentration 1.95 $mmol \cdot l^{-1}$

Gruppe/Behandlung (n)	pH-Werte 6.3	6.6	6.9	7.2	7.5
	Harnsäuretransportrate ($\mu mol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$)				
Beagle (9)	68.3 ± 41.2	152.4 ± 97.5	126.0 ± 49.1	85.2 ± 38.6	87.2 ± 47.2
Dalmatiner (9)	81.0 ± 37.7	181.2 ± 85.3	167.4 ± 95.3	98.9 ± 47.2	92.3 ± 55.9
SCP-Diät (10)	76.4 ± 57.6	159.6 ± 79.9	144.1 ± 87.3	95.3 ± 62.8	80.3 ± 50.3
Casein-Diät (8)	95.0 ± 42.6	175.9 ± 94.5	150.0 ± 66.5	88.5 ± 59.4	101.1 49.6

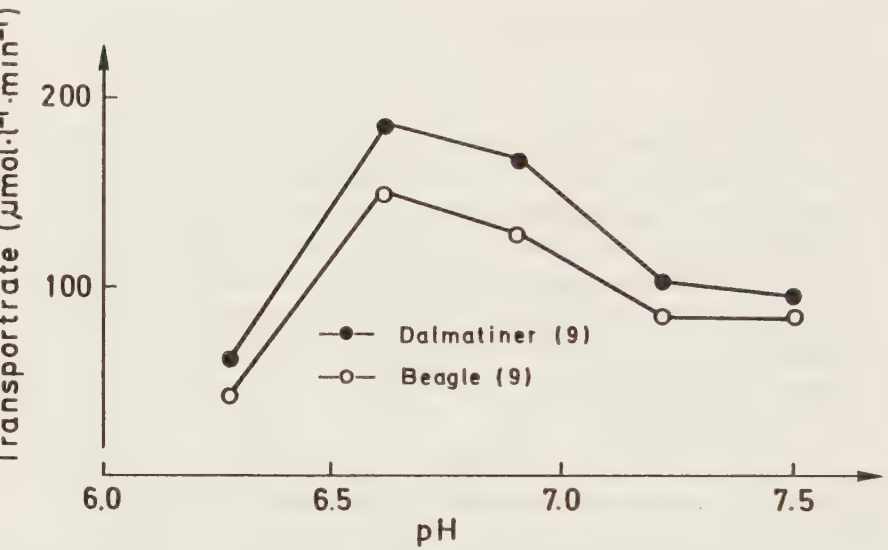

Abbildung 6: Transportrate von Harnsäure bei verschiedenen pH-Werten (vgl. Tab. 13)

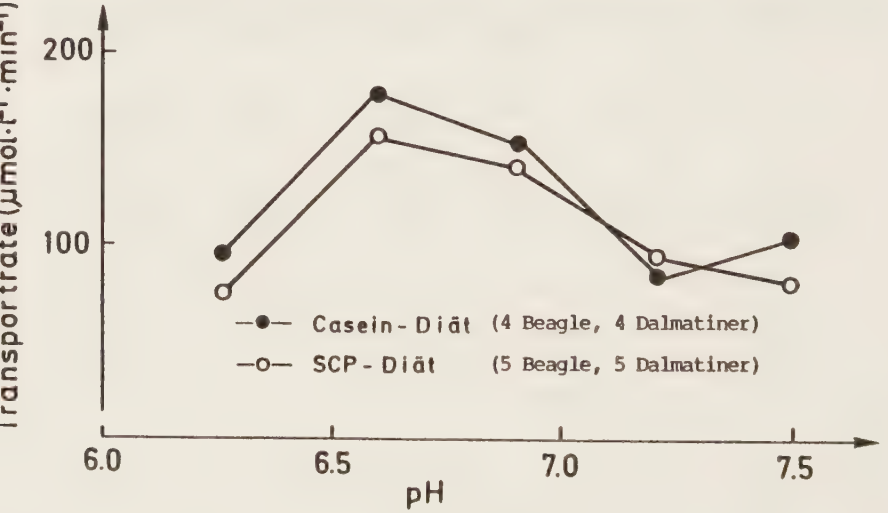

Abbildung 7: Transportrate von Harnsäure bei verschiedenen pH-Werten (vgl. Tab. 13)

Tabelle 16: Harnsäure-Aufnahme in den ersten 2 Minuten bei steigenden pH-Werten
Inkubationskonzentration 1.95 mmol·l^{-1}

Gruppe/Behandlung (n)	pH - Werte 6.3	6.6	6.9	7.2	7.5
	Harnsäure-Aufnahme (mmol·l^{-1})				
Beagle (9)	398 ± 98	475 ± 52	453^{++} ± 71	640^{++} ± 78	565^{+++} ± 127
Dalmatiner (9)	435 ± 107	480 ± 93	625^{++} ± 123	852^{++} ± 262	1169^{+++} ± 388
SCP-Diät (10)	± 423 ± 100	± 464 ± 90	536 ± 167	748 ± 215	782 ± 377
Casein-Diät (8)	408 ± 110	494 ± 69	543 ± 78	744 ± 234	945 ± 473

Unterschied zwischen Beagle und Dalmatiner signifikant mit: ++ = $p < 0.01$; +++ = $p < 0.001$.

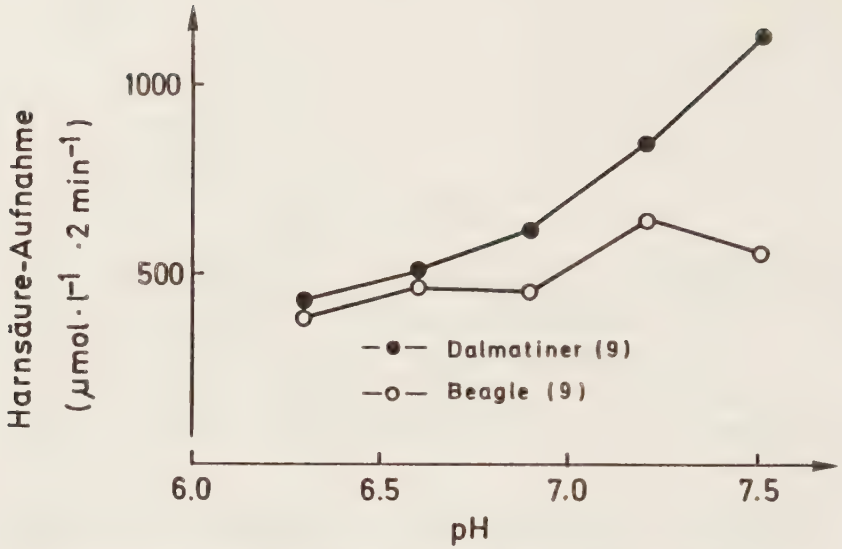

Abbildung 8: Initiale Harnsäure-Aufnahme bei steigendem pH-Wert (vgl. Tab. 14)

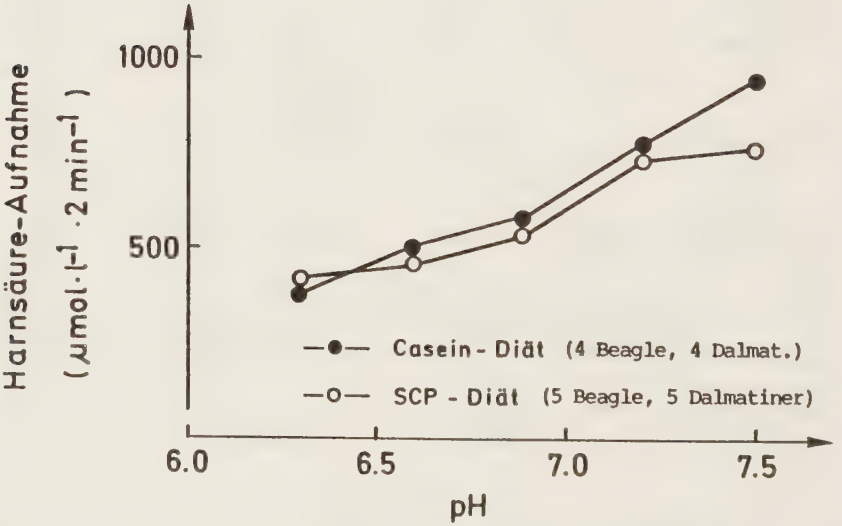

Abbildung 9: Initiale Harnsäure-Aufnahme bei steigendem pH-Wert (vgl. Tab. 14)

3.6. Nachweis der beschleunigten Austauschdiffusion für das Harnsäure-Transportsystem von Erythrozyten

Carrierabhängige Transportsysteme besitzen die Eigenschaft der beschleunigten Austauschdiffusion. Markierte Harnsäure in den Erythrozyten befindet sich im Gleichgewicht mit dem umgebenden Medium. Gibt man nun steigende Konzentrationen unmarkierter Harnsäure von außen zu, so wird die markierte Harnsäure im Innern der Erythrozyten beschleunigt nach außen und im Austausch dazu unmarkierte Harnsäure in die Erythrozyten transportiert (Infinite-Cis-Versuchsanordnung). Die Efflux-Geschwindigkeit der markierten Harnsäure strebt mit steigender Außenkonzentration von unmarkierter Harnsäure einer Höchstgeschwindigkeit (V_{max}) zu.

Tabelle 17 zeigt, daß sich oberhalb einer Außenkonzentration an unmarkierter Harnsäure von etwa 5 $mmol \cdot l^{-1}$ die Efflux-Transportgeschwindigkeit nicht mehr weiter steigert. Das Transportsystem für den Efflux von Harnsäure aus den Erythrozyten in das umgebende Medium besitzt Sättigungskinetik. Die in Tabelle 17 und den Abbildungen 10 und 11 sichtbar höheren Transportraten von Dalmatiner-Erythrozyten und Erythrozyten von Hunden mit SCP-Fütterung sind statistisch nicht signifikant.

Berechnet man jedoch die K_m und V_{max} für den Efflux markierter Harnsäure in der Infinite-Cis-Versuchsanordnung, so besitzt das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von SCP gefütterten Beagle und Dalmatinern eine signifikant höhere sK_m (Faktor 1.7; $p < 0.01$) und sV_{max} (Faktor 1.47; $p < 0.05$) als in Erythrozyten von Casein gefütterten Beagle und Dalmatinern (Tab. 18).

Tabelle 17: Harnsäure-Transportrate aus Erythrozyten bei einer Innenkonzentration von 10.7 $mmol \cdot l^{-1}$ und steigenden Außenkonzentrationen

Gruppe/Behandlung (n)	Harnsäureaußenkonzentration ($mmol \cdot l^{-1}$)				
	1.33	2.35	3.65	5.08	7.55
	Harnsäuretransportrate ($\mu mol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$)				
Beagle (9)	89.8 ± 38.8	146.9 ± 42.6	162.6 ± 42.3	179.0 ± 32.2	174.3 ± 42.0
Dalmatiner (9)	112.4 ± 75.8	169.1 ± 69.0	176.4 ± 71.9	202.6 ± 67.1	217.3 ± 81.7
SCP-Diät (9)	102.4 ± 55.7	170.2 ± 59.5	185.6 ± 60.3	206.6 ± 56.1	220.9 ± 80.1
Casein-Diät (9)	99.8 ± 66.5	145.8 ± 54.5	153.4 ± 53.6	175.0 ± 46.2	170.8 ± 40.7

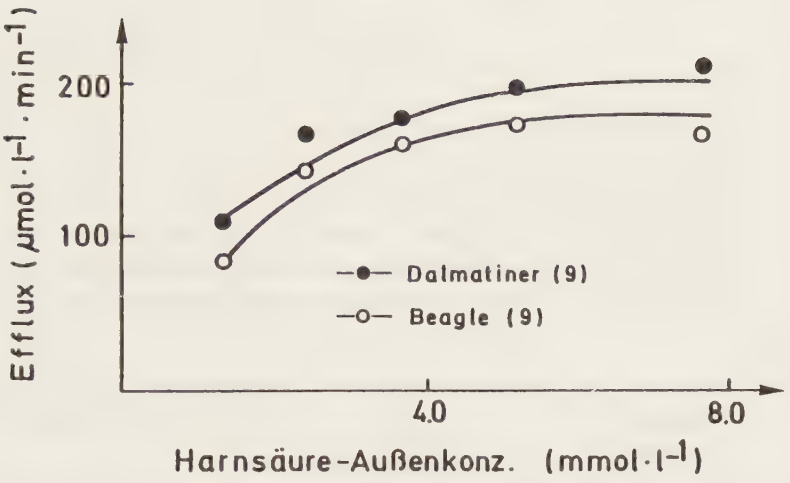

Abbildung 10: Harnsäure-Efflux in Abhängigkeit von der Harnsäure-Außenkonzentration (vgl. Tab. 15)

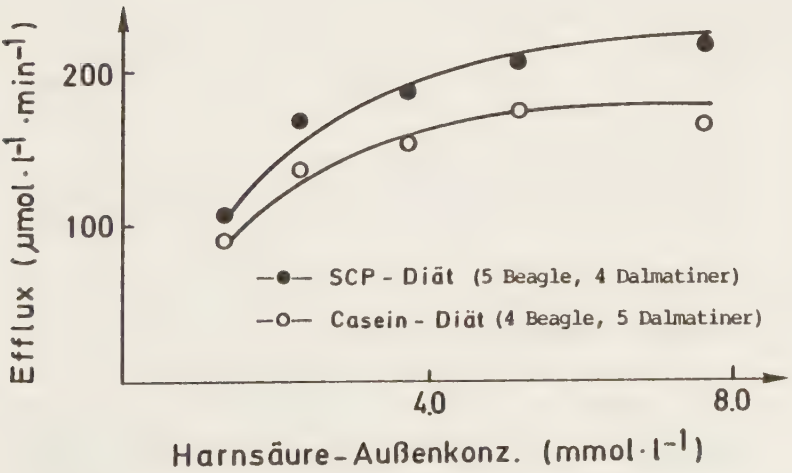

Abbildung 11: Harnsäure-Efflux in Abhängigkeit von der Harnsäure-Außenkonzentration (vgl. Tab. 15)

Tabelle 18: Kinetische Größen sK_m und sV_{max} des Harnsäure-Efflux in Abhängigkeit von der Harnsäure-Außenkonzentration bei Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner

Gruppe/Behandlung (n)	sK_m ($mmol \cdot l^{-1}$)	sV_{max} ($mmol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$)
Beagle (9)	2.322 ± 0.942	0.258 ± 0.092
Dalmatiner (9)	1.884 ± 0.737	0.278 ± 0.063
SCP-Diät (9)	2.717 ± 0.901 ++	0.323 ± 0.102 +
Casein-Diät (9)	1.526 ± 0.477	0.220 ± 0.052

Unterschied zwischen SCP- und Casein-Fütterung signifikant mit: + = $p < 0.05$; ++ = $p < 0.01$.

4. DISKUSSION

Mit Hilfe dieser Arbeit sollte das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Dalmatinern im Vergleich zu Nicht-Dalmatinern untersucht und die Frage geklärt werden, ob der Dalmatiner einen Harnsäure-Transportdefekt besitzt und die vermehrte, alimentäre Purinzufuhr durch die SCP-Fütterung einen Einfluß auf das Transportsystem ausübt.

4.1. Die Harnsäure-Aufnahme in Erythrozyten von Dalmatinern und Beagle

Nach den vorliegenden Daten (s. Abschnitt 3.1 bis 3.6) erfolgt die Harnsäure-Aufnahme in die Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern durch zwei unterschiedliche Komponenten:
Erstens eine schnelle Komponente, welche eine Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran darstellt, und zweitens eine langsame Komponente, die den eigentlichen Transport von Harnsäure in die Erythrozyten wiedergibt (Abb.1).

Die schnelle Komponente der Harnsäure-Aufnahme ist temperaturunabhängig (Abb.5), sättigbar (Tab.8), hemmbar (Tab.13, 14) und vor Erreichen der Gleichgewichtskonzentration beendet (Abb.1). Eine Diffusion dagegen zeigt keine Sättigung, ist temperaturunabhängig, nicht hemmbar und erst mit Erreichen der Gleichgewichtskonzentration beendet. Eine erleichterte Diffusion wiederum ist stark temperaturabhängig und erst bei Erreichen der Gleichgewichtskonzentration beendet.

Nur eine Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenoberfläche ist sowohl sättigbar, als auch temperaturunabhängig und erklärt auch,weshalb die Gesamtaufnahme an Harnsäure durch die Erythrozyten die Gleichgewichtskonzentration genau um den Betrag überschreitet, der durch die schnelle Komponente nach 2 Minuten erreicht wird (Abb.1). Bei der schnellen Komponente der Harnsäure-Aufnahme handelt es sich also eindeutig um eine Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran.

Dabei wird die Adsorption von Harnsäure durch Salicylat, Benzoat, Purin- und Pyrimidinderivate gehemmt (Tab.13, 14) und durch eine Erhöhung des pH gesteigert (Abb.8, 9), was die Adsorptionsstellen als unspezifisch kennzeichnet und auf eine bevorzugte Anlagerung dissozierter Harnsäure hinweist.

MÜLLER und FALKNER (1977) stellten eine 1.5 - 2fache Anhäufung von Hypoxanthin in menschlichen Erythrozyten fest und vermuteten ebenfalls eine zusätzliche Bindung von Hypoxanthin an die Erythrozytenmembran.

Die langsame Komponente der Harnsäure-Aufnahme unterscheidet sich grundsätzlich von dem Verhalten der schnellen Komponente. Die Harnsäure-Aufnahme durch die langsame Komponente ist erst beendet, nachdem der Konzentrationsausgleich zwischen Erythrozyten und umgebendem Medium erreicht ist (Abb.1).

In Erythrozyten von Menschen (LASSEN, 1961), wie auch in Erythrozyten von Dalmatinern und Beagle gibt es keine Hinweise auf einen Transport von Harnsäure gegen ein Konzentrationsgefälle, das heißt einen aktiven Transport.

Die Inkubationskonzentration und die Transportraten von Harnsäure zeigen keine lineare Beziehung, wie dies bei einer einfachen Diffusion zu erwarten wäre, sondern Sät-

tigungskinetik (Abb.3). Dies weist auf ein carrierabhängiges Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern hin mit einer K_m von 6.5 $mmol \cdot l^{-1}$ und einer V_{max} von etwa 470 $/umol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$ (Tab.7). LASSEN (1961) kennzeichnete das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten beim Menschen ebenfalls als carrierabhängig mit einer K_m von 3.2 $mmol \cdot l^{-1}$ und einer V_{max} von 63 $/umol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$.

Das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner besitzt im Vergleich zum Menschen eine geringere Affinität, was in der hohen K_m zum Ausdruck kommt. Allerdings liegt die V_{max} bei den beiden Hunderassen ganz beträchtlich höher.

Die langsame Komponente der Harnsäure-Aufnahme in Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner ist sehr stark temperaturabhängig (Tab.7). Die Temperaturkoeffizienten Q_{10} zwischen 27°C und 37°C betragen für Beagle und Dalmatiner etwa 2.6 (Tab.10), für den Menschen 2.2 (LASSEN, 1961). Eine einfache Diffusion besitzt im gleichen Temperaturbereich einen Q_{10} Wert von 1.07 (LASSEN, 1961). Der starke Temperatureinfluß erklärt sich aus der Beteiligung von Carrierproteinen und ist Ausdruck einer zunehmenden kinetischen Energie der beteiligten Moleküle (BUDDECKE, 1977), was sich bis 37°C positiv auf die Bindungsaffinität zwischen Carrierproteinen und Harnsäure auswirkt (EIDELMANN und CABANTCHIK, 1983).

Purin- und Pyrimidinderivate (Tab.11) sowie Anionentransportinhibitoren (Tab.12) hemmen die langsame Komponente der Harnsäureaufnahme. Dies läßt auf ein gemeinsames Transportsystem von Purin- und Pyrimidinderivaten und organischen Anionen in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern schließen und charakterisiert den Carrier dieses Transportsystems als unspezifisch. Zu den gleichen

Ergebnissen gelangte man bei Untersuchungen an Erythrozyten beim Menschen mit Zusätzen von Hypoxanthin (LASSEN und OVERGAARD-HANSEN, 1962 a) und Purinderivaten (LASSEN und OVERGAARD-Hansen, 1962 b), sowie Anionentransportinhibitoren (LUCAS-HERON u. FONTENAILLE, 1979).

Die Hemmung der Glykolyse führt in Erythrozyten beim Menschen (LUCAS-HERON u. FONTENAILLE, 1979) und nach eigenen Ergebnissen bei Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern (Tab.12) zu einer Verminderung der Harnsäure-Transportrate und einer geringeren Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran (Tab.14). Der ATP-Mangel wirkt sich also nicht auf die Carrierproteine selbst, sondern primär auf die Struktur der Erythrozytenmembran aus. Die Form des Erythrozyten wird durch ein dichtgepacktes Spectrin-Actin Proteinskelett gewährleistet, das 50 - 70 % der Erythrozytenoberfläche bedeckt. Dieses Proteinskelett stabilisiert die Carrierproteine in ihrer Lage und gewährleistet dadurch ihre Funktion als Transportsystem (HAEST, 1982). Wegen der raschen morphologischen Veränderungen der Erythrozyten innerhalb von 60 Minuten bei Energiemangel infolge einer ATP-Verarmung (NAKAO et al., 1960), ist ATP vermutlich in erster Linie für den Erhalt des Proteinskeletts verantwortlich. Eine ATP-Verarmung führt deshalb zu einer Veränderung der Erythrozytenoberfläche und somit der Adsorptionsaffinitäten und über eine mangelhafte Stabilisierung der Carrierproteine auch zu einer Hemmung des Transportes von Harnsäure.

Die pH-Aktivitätskurve des Harnsäure-Transportes (Abb.6, 7) zeigt ein pH-Optimum zwischen pH 6.6 und pH 6.9. Sie entspricht damit der Dissoziationsrestkurve eines Ampholyten und resultiert aus den Dissoziationskurven der kationischen und anionischen Gruppen (BUDDECKE, 1977). Eine derartige pH-Abhängigkeit des Harnsäure-Transportes in Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner kann nur mit

der Beteiligung von Carrierproteinen am Harnsäuretransport erklärt werden. Die Carrierproteine bestehen aus Aminosäuren, die aufgrund ihrer Carboxyl- und Aminogruppen amphotere Eigenschaften aufweisen. Sie erreichen nur bei einem bestimmten Ionisierungszustand dieser sauren und basischen Gruppen ihre maximale Aktivität. Im Bereich des pH-Optimums befinden sich auch die pK-Werte der kationischen und anionischen Gruppen.

Ein ähnlicher Kurvenverlauf des Harnsäure-Transportes in Abhängigkeit des pH wurde bei Erythrozyten-Ghosts vom Menschen (LUCAS-HERON u. FONTENAILLE, 1979), in Bürstensaummembranvesikel der Kaninchenniere (BOUMENDIL-PODEVIN et al., 1979) und bei der Reabsorption von Harnsäure im proximalen Tubulus der Kaninchenniere (BERNDT u. BEECHWOOD, 1965) gefunden. Bei intakten Erythrozyten des Menschen fällt die Harnsäure-Transportrate im gleichen pH-Bereich linear ab (LASSEN, 1961; LUCAS-HERON u. FONTENAILLE, 1977; LUCAS-HERON u. FONTENAILLE, 1979). Möglicherweise liegen die pK-Werte der anionischen und kationischen Gruppen von Carrierproteinen von Erythrozyten des Menschen unterhalb pH 6.3, und somit ist auch das pH-Optimum weiter in den sauren Bereich verlagert. Die Messung der Harnsäure-Transportrate zwischen pH 6.3 und 7.5 erfaßt deshalb auch nur den absteigenden Schenkel der pH-Aktivitätskurve. Die Frage, ob Harnsäure dissoziiert oder undissoziiert transportiert wird, kann aus dem Verlauf der Carrieraktivitätskurve (Abb.6) nicht beantwortet werden.

Der Nachweis eines beschleunigten Transportes von markierter Harnsäure aus den Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern bei steigenden Außenkonzentrationen an unmarkierter Harnsäure (Abb.10; Tab.17), zeigt, daß Influx und Efflux einander beeinflussen. Diese Eigenschaft besitzen nur carrierabhängige Transportsysteme (WILBRANDT,

1972). Die beschleunigte Austauschdiffusion (Transeffekt) ist möglich, wenn die beladenen Carrier eine höhere Geschwindigkeitskonstante aufweisen, als die freien Carrier. Sind alle Carrier auf ihrem Rückweg zur Innenseite der Erythrozytenmembran mit unmarkierter Harnsäure besetzt, so steht dem Transport von markierter Harnsäure aus dem Erythrozyten die maximale Carrierzahl pro Zeiteinheit zur Verfügung und er erreicht die maximale Transportgeschwindigkeit und zeigt Sättigungskinetik. Damit wird auch ein Porenmodell für den Transport von Harnsäure in Erythrozyten ausgeschlossen, denn es würde bei einer hohen Außenkonzentration von Harnsäure kein Efflux von Harnsäure mehr stattfinden (STEIN u. LIEB, 1973).

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben den Schluß, daß die Harnsäureaufnahme in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern aus einer Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran und einer carrierabhängigen erleichterten Diffusion von Harnsäure in die Erythrozyten besteht.

4.2. Rassebedingte Unterschiede zwischen der Harnsäure-Aufnahme in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern

Die langsame Komponente, das heißt das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern, ist bei beiden Hunderassen gleich.

Rassebedingte Unterschiede zeigten sich nur bei der pH-Abhängigkeit der schnellen Komponente, das heißt der Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran (Abb.8). Dalmatiner absorbierten bei steigendem pH bis 100 % mehr Harnsäure an die Erythrozytenoberfläche als Beagle. Nach GREGER et al. (1974) haben die Erythrozyten des Menschen neben den Plasmaproteinen, die 10 - 15 % der Harnsäurekonzentration im Plasma binden (BERTOLINI u. MASAREI, 1979), eine Adsorptionskapazität von etwa 25 % der Harnsäurekonzentration im Plasma und damit eine große Bedeu-

tung für die Reabsorption von Harnsäure im Nierenmark. Zwischen dem stark konzentrierten Harnsäuregehalt der Henleschen Schleifen und den benachbarten Blutgefäßen (Vasa recta) besteht ein Konzentrationsgefälle, so daß nach dem Gegenstromprinzip Harnsäure an die Erythrozyten und die Plasmaproteine gebunden wird. Vom Menschen ist auch bekannt, daß eine Acidose im Blut die Harnsäureausscheidung erhöht (ISOMÄKI u. KREUS, 1968), was nach GREGER et al. (1974) auf einer geringeren Harnsäureadsorption bei niederem pH beruht. Die geringere Harnsäureadsorption bei niederem pH wird durch die eigenen Ergebnisse bestätigt (Abb.8). In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß eine Alkalisierung des Harnes als Prophylaxe der Urolithiasis beim Dalmatiner beschrieben wurde (BOVEE, 1973). An diesem Therapieerfolg könnte neben der besseren Löslichkeit der Harnsäure auch die höhere Adsorptionskapazität von Dalmatiner-Erythrozyten bei alkalischem pH beteiligt sein. Möglicherweise ist die höhere Harnsäure-Adsorptionskapazität der Dalmatiner-Erythrozyten eine Anpassung an die hohen Harnsäurekonzentrationen im Plasma und schützt den Dalmatiner vor einer zu hohen Harnsäurekonzentration im harnableitenden System und mindert die Gefahr der Urolithiasis.

4.3. Fütterungseinflüsse durch SCP- und Casein-Diät auf die Harnsäureaufnahme

Im Gegensatz zu den rassebedingten Unterschieden zeigten sich fütterungsbedingte Unterschiede der Harnsäureaufnahme nur bei der langsamen Komponente, das heißt beim Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern.

Die kinetischen Größen K_m und V_{max} für den Influx von Harnsäure waren bei Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern auf SCP-Diät signifikant höher als bei Erythrozyten von Hunden auf Casein-Diät (Tab.7). Ebenso wurde der

Efflux von Harnsäure durch steigende Harnsäure-Außenkonzentrationen bei ersteren stärker beschleunigt als bei letzteren (Abb.11).

Die höhere K_m ist Ausdruck einer geringeren Affinität, die höhere V_{max} weist auf eine höhere Transportkapazität des Harnsäure-Transportsystems in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern auf SCP-Diät hin.

Wie könnte man sich nun den Zusammenhang zwischen der höheren K_m und V_{max} als Folge der geringeren Aktivität zwischen Carrier und Substrat (Harnsäure) erklären?

In Anlehnung an das Enzymmodell von Michaelis-Menten wird auch bei carrierabhängigen Transportprozessen ein Intermediärprodukt, der sogenannte Carrier-Substratkomplex (CS), gebildet. Es gilt folgende Beziehung:

Außenseite ——— Erythrozytenmembran ——— Innenseite

$$S + C \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (CS) \xrightarrow{k_3} C + S$$

S = Substrat
C = Carrier
k_1/k_2 = Dissoziationskonstante des Carrierkomplexes
k_3 = Wechselzahl

und ausgehend von der Michaelis-Menten-Gleichung können die kinetischen Parameter K_m und V_{max} folgendermaßen definiert werden:

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \qquad V_{max} = k_3 \times (C_{total})$$

(CHRISTENSEN, 1975)

Damit ist die Erhöhung beider kinetischen Parameter nur mit einer Erhöhung der Wechselzahl k_3 zu erklären. Eine

Steigerung von V_{max} durch eine höhere Gesamtkonzentration des Carriers ist unwahrscheinlich, da durch die unterschiedliche Fütterung keine Änderung des Erythrozytenvolumens beobachtet wurde (Hinweis auf unveränderte Erythrozytenzahl) und Erythrozyten nicht in der Lage sind, neue Carrierproteine zu synthetisieren. Die Wechselzahl k_3 kann durch eine Konformationsänderung des Carrierproteins beeinflußt werden. Eine endgültige Aussage über die Ursachen der Veränderungen im Harnsäure-Transportsystem der Erythrozyten ist jedoch mit den vorliegenden Daten nicht möglich

Wird die verminderte Affinität des Carriers für Harnsäure bei Erythrozyten von SCP gefütterten Tieren durch einen erhöhten Harnsäure-Plasmaspiegel infolge der vermehrten alimemtären Purin-Zufuhr hervorgerufen ?

16 Stunden nach der Fütterung stellte GALLENMÜLLER (1984) bei Dalmatinern auf SCP-Diät eine Harnsäure-Plasmakonzentration von 133 $\pm$ 32 $/umol \cdot l^{-1}$, bei Dalmatinern auf Casein-Diät von 56 $\pm$ 5 $/umol \cdot l^{-1}$, bei Beagle auf SCP-Diät von 31 $\pm$ 17 $/umol \cdot l^{-1}$ und bei caseingefütterten Beagle von 20 $\pm$ 3 $/umol \cdot l^{-1}$ fest. Die durchschnittlichen Harnsäure-Plasmakonzentrationen von Dalmatinern bei SCP-Ernährung waren gegenüber den in gleicher Weise gefütterten Beagle etwa doppelt so hoch und kommen deshalb als Ursache für die bei Hunden beider Rassen auf SCP-Diät gleichermaßen stark erhöhten K_m und die besonders bei SCP gefütterten Beagle gesteigerte V_{max} (Tab.7) gegenüber caseingefütterten Beagle und Dalmatiner nicht in Betracht.

Auch beim Menschen wurde nicht bei allen Hyperuricämikern eine verminderte Harnsäure-Transportrate in die Erythrozyten gefunden (GREGER et al., 1974)

5. ZUSAMMENFASSUNG

Um das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Hunden der Rasse Beagle und Dalmatiner zu beschreiben, sowie fütterungs- und rassebedingte Einflüsse zu erfassen, wurden an insgesamt 20 weiblichen Dalmatiner- und an 16 weiblichen Beagle-Hunden, die je zur Hälfte eine Casein- oder eine SCP-Diät erhielten, Harnsäure-Transportversuche mit 2-^{14}C-Harnsäure durchgeführt. Die Abhängigkeit des Harnsäuretransportsystems von der Zeit, der Inkubationskonzentration, der Temperatur, dem pH-Wert sowie der Einfluß von Inhibitoren wurden mit einer Zero-Trans-Versuchsanordnung überprüft. Eine Infinite-Cis-Versuchsanordnung diente zum Nachweis einer beschleunigten Austauschdiffusion (Trans-Effekt).

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die Harnsäureaufnahme in Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner zeigte eine schnelle Komponente, die nach 2 Minuten gesättigt ist, und eine langsame nach 40 Minuten gesättigte Komponente.

2. Die schnelle Komponente war gekennzeichnet durch Sättigung vor Erreichen des Konzentrationsausgleichs, begrenzte Aufnahmekapazität, Temperaturabhängigkeit, pH-Abhängigkeit, Glykolyseabhängigkeit, Unspezifität und characterisiert somit eine Adsorption von Harnsäure an die Erythrozytenmembran von Beagle und Dalmatiner.

3. Erythrozyten von Dalmatinern adsorbierten bei steigendem pH-Wert (6.3 - 7.5) bis zu 100 % mehr Harnsäure als Erythrozyten von Beagle. Die Fütterung mit SCP und Casein beeinflußte die Harnsäureadsorption an die Erythrozytenmembran nicht.

4. Die langsame Komponente war charakterisiert durch eine Harnsäure-Aufnahme bis zur Gleichgewichtskonzentration, Sättigungskinetik, ferner Temperatur (Q_{10}= 2.6)-, Glykolyse- und pH-Abhängigkeit, sowie Unspezifität und beschleunigte Austauschdiffusion. Sie stellt somit eine erleichterte Diffusion von Harnsäure in Erythrozyten von Beagle und Dalmatiner (K_m = 6.5 mmol·l^{-1}; V_{max} = 380 µmol·l^{-1}·min^{-1}) ohne rassebedingte Unterschiede dar.

5. Das Harnsäure-Transportsystem in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern auf SCP-Diät hatte eine 2.6fach höhere K_m (9.8 mmol·l^{-1}) und eine 1.7fach höhere V_{max} (484 µmol·l^{-1}·min^{-1}) als dasselbe System in Erythrozyten der Kontrolltiere (K_m = 3.7 mmol·l^{-1}; V_{max} = 286 µmol·l^{-1}·min^{-1}).

6. Purin- und Pyrimidinderivate, sowie organische Anionen benutzen ein gemeinsames Transportsystem in Erythrozyten von Beagle und Dalmatinern.

Aus diesen Ergebnissen wird gefolgert, daß der Harnsäure-Transport in Erythrozyten von Dalmatiner- und Beagle-Hunden mittels des gleichen Systems der erleichterten Diffusion erfolgt. Die Hypothese von einem generalisierten Transportdefekt ist damit widerlegt. Purinreiche Ernährung beeinflußt die kinetischen Größen des Harnsäure-Transports in Erythrozyten beider Hunderassen.

SUMMARY

Uric acid transport in erythrocytes of Beagle and Dalmatian dogs.

Uric acid uptake in erythrocytes of Beagle and Dalmatian dogs has been measured by zero trans influx and infinite cis procedures.

Conclusions were as follows:

1. Urate uptake in dog erythrocytes is characterized by two components: a fast one equilibrating after two minutes and a slow one equilibrating after 40 minutes

2. The fast component showed saturation before reaching equilibration concentration and limited uptake capacity. Uptake was independent of temperature but dependent of pH and was inhibited by purine and pyrimidine derivatives and anion transport inhibitors and was effected by intraerythrocyte glycolysis. So the fast component of urate uptake probably exhibits an adsorption of urate on erythrocyte surface.

3. The slow component showed saturation kinetics (K_m = 6.6 $mmol \cdot l^{-1}$; V_{max} = 390 $\mu mol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$ for all dogs) and acceleration exchange diffusion. Uptake was dependent of temperature (Q_{10} = 2.6) and pH and was inhibited by purine and pyrimidine derivatives and anion transport inhibitors and was effected by intraerythrocyte glycolysis. So urate uptake by the slow component is apparently due to transmembranic transport into erythrocytes by facilitated diffusion.

4. Except a significant higher adsorption on erythrocyte surface above pH 6.3 in Dalmatian dog no further differences of urate uptake in erythrocytes of Beagle and Dalmatian dog have been detected indicating that

the uniqueness of purine metabolism in Dalmatian dog is not due to a generalized defect of uric acid transport.

5. Dietary purines highly influenced urate transport through erythrocyte membrane. Feeding of single cell protein (SCP) with high content of nucleic acid resulted in significant higher K_m of 9.8 $mmol \cdot l^{-1}$ and significant higher V_{max} of 484 $\mu mol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$ compared to dogs receiving a low purine control diet (K_m = 3.7 $mmol \cdot l^{-1}$; V_{max} = 286 $\mu mol \cdot l^{-1} \cdot min^{-1}$).

6. LITERATURVERZEICHNIS

AFZELIUS, B.A., 1965

The occurence and structure of microbodies: A comparative study.

J. Cell. Biol. 26, 835 - 843

ANDREINI, P.H., R.H. DECKER, W.N. TAUXE, L.E. WARD, 1966

Increased uricolysis in liver homogenates from Dalmatian as compared to Non-Dalmatian-Dogs: Further evidence supporting a cellular transport defect in the Dalmatian.

Arthritis Rheum. 9, 845 - 851

APPLEMAN , R.M., G.A. HALLENBECK, R.G. SHORTER, 1966

Effect of reciprocal allogeneic renal transplantation between Dalmatian and Non-Dalmatian-Dog on urinary excretion of uric acid.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 1094 - 1097

BENEDICT, S.R., 1916

Uric acid in its relations to metabolism.

Harvey Lect. 11, 346 - 365

BERLIN, R.D., R.A. HAWKINS, 1968

Secretion of purines by the small intestine: general characteristics.

Am. J. Physiol. 215, 932 - 941

BERNDT, W.O., E.C. BEECHWOOD, 1965

Influence of inorganic electrolytes and ouabain on uric acid transport.

Am. J. Physiol. 208, 642 - 648

BERTOLINI, J., J.R.L. MASUREI, 1979

The binding of urate by plasma proteins.

Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci. 57, 51 - 60

BLOMSTEDT, J.W., P.S. ARONSON, 1980

pH-gradient stimulated transport of urate and para-aminohippurate in dog renal microvillus membran vesicles.

J. Clin. Invest. 65, 931 - 934

BOUMENDIL-PODEVIN, E.F., R.A. PODEVIN, C. PRIOL, 1979

Uric acid transport in brush border membran vesicles isolated from rabbit kidney.

Am. J. Physiol. 236, F 519 - 525

BOVEE, K.C., 1973

Urolithisasis in the dog.

J. Am. Vet. Med. Ass. 162, 1012 - 1013

BUDDECKE, E., 1977

Enzyme.

In: Buddecke E., Grundriss der Biochemie, 5. Auflage, 13 - 30, Walter de Gruyter, Berlin, New York

CHONKO, A.M., 1980

Urate secretion in isolated rabbit renal tubules.

Am. J. Physiol. 239, F 545 - 551

CHRISTENSEN, H.N., 1975

Biological Transport. Second Edition W.A. Benjamin, Inc., London, Amsterdam, Don Mills, Ontario, Sidney, Tokyo.

DANTZLER, W.H., 1973

Characteristics of urate transport by isolated perfused snake proximal renal tubular.

Am. J. Physiol. 224, 445 - 453

DUKES, C.E., D.A. STEPLOCK, A.M. KAHN, E.J. WEINMAN, 1982

The transport of urate in the small intestine of the rat.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 171, 19 - 23

DUNCAN, H., A.S. CURTISS, 1971

Observations on uric acid transport in man, the Dalmatian and the non-Dalmatian dog.
Henry Ford Hosp. Med. J. 19, 105 - 114

EILAM, Y., W.D. STEIN, 1974

Kinetic studies of transport across red blood cell membranes.

Methods Membrane Biol. 2, 283 - 319

EIDELMANN, D., Z.J. CABANTCHIK, 1983

The mechanism of anion transport across human red blood cell membranes as revealed with a fluorescent substrate.

J. Membr. Biol. 71, 141 - 148

FANELLI, G.M., D.L. BOHN, S. STAFFORD, 1970

Functional characteristics of renal urate transport in the Cebus monkey.

A. J. Physiol. 218, 627 - 636

FANELLI, G.M., D.L. BOHN, S.S. REILLY, I.M. WEINER, 1973

Effects of mercurial diuretics on renal transport of urate in the chimpanzee.

Am. J. Physiol. 224, 985 -992

FRIEDMANN, M., S.O. BYERS, 1948

Observations concerning the causes of the excess excretion of uric acid in the Dalmatian dog.

J. Biol. Chem. 175, 727 - 735

GAEBLER, S., 1981

Untersuchungen über den Purinstoffwechsel des Dalmatiner-Hundes bei erhöhter Aufnahme von Nucleinsäuren.

Diss. Vet. Med., München

GALLENMÜLLER, M., 1984

Zur Verträglichkeit von Probion bei Dalmatiner und Beagle.

Diss. Vet. Med., München

GREGER, R., F. LANG, F. PULS, P. DEETJEN, 1974

Urate interaction with plasma proteins and erythrozytes.

Pflügers Arch. 352, 121 - 133

GUTMAN , A.B., T.F. YÜ, 1961

A three component system for regulation of renal excretion of uric acid in man.

Trans. Assoc. Am. Physicians 74, 353 - 364

HAEST, C.W.M., 1982

Interactions between membrane skeleton proteins and the intrinsic domain of the erythrozyte membrane.

Biochim. Biophys. Acta 694, 331 - 352

HANISCH, M.E., A.L. LAWRENCE, 1972

Purine und pyrimidine absorption by the gut of the chiton cryptochiton stelleri.

Comp. Biochem. Physiol. 42, 601 - 610

HARVEY, A.M., H.N. CHRISTENSEN, 1964

Uric acid transport system: Apparent absence in erythrocytes of the dalmatian coach hound.

Science 145, 826 - 827

HAWKINS, R.A., R.D. BERLIN, 1969

Purine transport in polymorphonuclear leukocytes.

Biochim. Biophys. Acta 172, 324 - 337

HOFSTEE, B.H.J., 1959

Non-inverted versus inverted plots in enzyme kinetics.

Nature, 184, 1296 - 1298

ISOMÄKI, H., K. KREUS, 1968

Serum and urinary uric acid in respiratory acidosis.

Acta Med. Scand. 184, 293 - 299

KESSLER, R.H., K. HIERHOLZER, R.S. GURD, 1959

Localization of urate transport in the nephron of mongrel and Dalmatian dog kitney.

Am. J. Physiol. 197, 601 - 603

KHAN, A.H., S. WILSON, J.C. CRAWHALL, 1975

The influx of uric acid and other purines into everted jejunal sacs of the rat and hamster.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 53, 113 - 119

KIPPEN ., N. NAKATA, J.R. KLINENBERG, 1977

Uptake of uric acid by separated renal tubules of the rabbit. I. Characteristics of transport.

J. Pharm. Exp. Ther. 201, 218 - 225

KLEMPERER, F.W., H.C. TRIMBLE, A.B. HASTING, 1938

The uricase of dogs, including the Dalmatians.

J. Biol. Chemistry 125, 445 - 449

KLINGENBERG, M., E. PFAFF, 1967

Means of terminating reactions.

In: COLOWICH, S.P., N. KAPLAN,
Methods in Enzymology, Vol X, 680 - 684,
Acedemic Press, New York, London

KREEL VAN, B.K., J.P. DIJK VAN, 1977

Transport of uric acid and hypoxanthine across the isolated guinea pig placenta.

Biol.Neonate. 32, 260 - 265

KUSTER, G., R.G. SHORTER, B. DAWSON, G.A. HALLENBECK, 1972

Uric acid metabolism in Dalmatians and other dogs (Role of the liver).

Arch. Intern. Med. 129, 492 - 496

LANG, F., R. GREGER, H. SILBERNAGEL, R. GÜNTHER,

P. DEETJIN, 1975

Aufnahme von 2-C^{14}-Urat in die Erythrozyten von Patienten mit Hyperuricämie und Gicht.

Klin. Wochenschrift 53, 261 - 264

LASSEN, U.V., 1961

Kinetics of uric acid transport in human erythrocytes .

Biochim. Biophys. Acta 53, 557 - 569

LASSEN, U.V., K. OVERGAARD-HANSEN, 1962 a

Hypoxanthine as inhibitor of uric acid transport in human erythrocytes.

Biochim. Biophys. Acta 57, 111 - 117

LASSEN, U.V., K. OVERGAARD-HANSEN, 1962 b

Purine derivates as inhibitors of uric acid transport into human erythrocytes.

Biochim. Biophys. Acta 57, 118 - 122

LUCAS-HERON, B., C. FONTENAILLE, 1977

Uric acid transport characteristics in human erythrocytes.

Adv. Exp. Med. Biol. 76 B, 151 - 158

LUCAS-HERON, B., C. FONTENAILLE, 1979

Urate transport in human red blood cells. Activation by ATP.

Biochim. Biophys. Acta 553, 284 - 294

MAZUE, G., J. BERTHE, B. DUPUIS, P. GROS, 1977

Etude des principales constantes sanguines du chien dalmate.

Revue Méd. Vét. 128, 639 - 652

MERTZ, D.P., 1970

Experimental observations and mathematical considerations in the mechanism of transport of uric acid across human gastric mucosa.

Pflügers Arch., 316, 132 - 139

MERTZ, D.P., 1973

Gicht.

Grundlagen, Klinik und Therapie, 2. Auflage Georg Thieme Verlag, Stuttgart

MOULIN, B., P. VINAY, N. DUONG, A. GOUGOUX,

J. LEMIEUX, 1982

Net urate reabsorption in the Dalmatian coach hound with a note on automated measurement of urate in species with low plasma urate.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 60, 1499 - 1504

MÜLLER, M.M., G. FALKNER, 1977

Uptake of hypoxanthine in human erythrocytes.

Adv. Exp. Med. Biol. 76 B 131 - 138

MUDGE, G.H., W.O. BERNDT, H. VALTIN, 1973

Tubular transport of urea, glucose, phosphate, uric acid, sulfate and thiosulfate.

In: ORLOFF, J., R.W. BERLINER, Handbook of Physiology, Washington, D.C., Am Physiol. Soc., 1973, 555 - 586

MYERS, V.C., R.F. HANZAL, 1946

The metabolism of methylxanthine and their related methyluric acids.

J. Biol. Chemistry 162, 309 - 323

NAKAO, M., T. NAKAO, S. YAMAZOE, 1960

Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells.

Nature 187, 945 - 946

OH, J.H., J.B. DOSSETOR, J.T. BECK, 1967

Kinetics of uric acid transport and its production in rat small intestine.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 45, 121 - 127

PRITCHARD, J.B., N. O'CONNOR, J.M. OLIVER, R.D. BERLIN, 1975

Uptake and supply of purine compounds by the liver.

Am. J. Physiol. 229(4), 967 - 972

REEVES, J.R., 1975

Stimulation of 3-O-methylglucose transport by anaerobies in rat thymocytes.

J. Biol. Chem. 250, 9413 - 9420

ROCH-RAMEL, F., N.L.M. WONG, J.H. DIRKS, 1976

Renal excretion of urate in mongrel and Dalmatian dogs: a micropuncture study.

Am. J. Physiol. 231, 326 - 331

ROCH-RAMEL, F., 1977

Excrétion rénale de l'acide urique.

J. Physiol.(Paris) 73, 891 - 901

ROCH-RAMEL, F., F. WHITE, L. VOWLES, H.A. SIMMONDS, J.S. CAMERON, 1980

Micropuncture study of tubular transport of urate and PAH in the pig kidney.

Am. J. Physiol. 239, F 107 - 112

ROSENBERG, L.E., S.J. DOWNING, St. SEGAL, 1962

Extracellular space estimation in rat kidney slices using ^{14}C-saccarides and phlorizin.

Am. J. Physiol. 202, 800 - 804

SACHS, L., 1972

Statistische Auswertungsmethoden.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

SANSOM, S.C., Y.J. KUO, L.L. SHANBOUR, E.J. WEINMAN, 1982

The transport of urate in frog gastric mucosa.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 170, 363 - 366

STEIN, W.D., W.R. LIEB, 1973

A necessary simplifikation of the kinetics of carrier transport.

Israel J. Chem. 11, 325

SENEKJIAN, H.O., T.F. KNIGHT, E.J. WEINMAN, 1981

Urate transport by the isolated perfused S_2 segments of the rabbit.

Am. J. Phys. 240, F 530 - F 535

SORENSEN, L.B., 1960

Elimination of uric acid in man studied by means of ^{14}C-labelled uric acid.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12, Suppl. 54, 1 - 214

SORENSEN, L.B., D.J. LEVINSON, 1975

Evidence for four components in the renal handling of uric acid in man.

In: SILBERNAGEL, S., F. LANG, R. GREGER: Amino acid transport and uric acid transport. Symposium Innsbruck, Thieme-Verlag, Stuttgart, 243 - 248

SORENSEN , L.B., 1976

Excretion of uric acid in health and in disease.

In: ZÖLLNER, N., W. GRÖBNER,

Gicht. Handbuch der Inneren Medizin, Bd. 7, Teil 3

142 - 160, 6. Auflage

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

STRYER, L., 1978

Einführung in die Enzyme.

In: STRYER, L., Biochemie, 77 - 101

Vieweg Friedrich und Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig

TIEMEYER, W., S. GAEBLER, D. GIESECKE, 1981

HPLC-Analytik von Nucleinsäuren in Nahrungsmitteln sowie von Nucleinsäuremetaboliten in Stoffwechseluntersuchungen.

Landwirtschaftliche Forschung, Sonderheft 38, Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main

UMBREIT, W.W., R.H. BURRIS, J.F. STAUFER, 1972

Methods for preparation and study of tissue and enzymes.

In: Manometric Biochemical Techniques, Vol 5th.,

Burgiss Publishing Company

VINAY, P., A. GATTEREAU, B. MOULIN, A. GOUGOUX,

G. LEMIEUX, 1983

Normal urate transport into erythrocytes in familial renal hypouricaemia and in the Dalmatian dog.

Can. Med. Assoc. J. 128, 545 - 549

WEINER, I.M. 1979

Urate transport in the nephron.

Am. J. Physiol. 237, F 85 - 92

WELLS, H.G., 1981

The purine metabolism of the Dalmatian Coach Hound.

J. Biol. 35, 221 - 225

WEINMAN, E.J., H.O. SENEKJIAN, S.C. SANSOM, D. STEPLOCK, A. SHETH, T.F. KNIGHT, 1981

Evidence for active and passive urate transport in the rat proximal tubule.

Am. J. Physiol. 240, F 90 - 93

WILBRANDT, W., 1972

Carrier diffusion.

In: MANSON, L.A., Biomembranes, Vol. 3, 79 - 99 Plenum Press, New York, London

WILKINSON, G.N., 1961

Statistical estimations in enzyme kinetics.

Biochem. J. 80, 324 - 332

WOLFSON, W.Q., C. COHN, C. SHORE, 1950

The renal mechanism for urate excretion in the Dalmatian Coach Hound.

J. Exp. Med. 92, 121 - 128

YOUNG, E.G., C.F. CONWAY, W.A. CRANDALL, 1938

On the purine metabolism of the Dalmatian Coach Hound.

Biochem. J. 32, 1138 - 1145

YÜ, T.F., L. BERGER, S. KUPFER, A.B. GUTMAN, 1960

Tubular secretion of urate in the dog.

Am. J. Physiol. 199, 1199 - 1204

YÜ, F.F., A.B. GUTMANN, L. BERGER, C. KAUNG, 1971

Low uricase activity in the dalmatian dog simulated in mongrels given oxonic acid.

Am. J. Physiol. 220, 973 - 979

ZINS, G.R., I.M. WEINER, 1968

Bidirectional urate transport limited to the proximal tubule in dogs.

Am. J. Physiol. 215, 411 - 421

LEBENSLAUF

Am 6. 12. 57 wurde ich, Karl Josef Hoferer, als Sohn des Maurermeisters Robert Hoferer und dessen Ehefrau Maria Hoferer, geb. Brüderle, in Gengenbach geboren.

Vom April 1964 bis Juli 1968 besuchte ich die Volksschule in Ohlsbach, anschließend das Schiller-Gymnasium in Offenburg, wo ich im Mai 1977 die Reifeprüfung ablegte.

Vom 1. Juli 1977 bis 30. September 1978 diente ich als Wehrpflichtiger bei der Bundeswehr.

Das Studium der Tiermedizin absolvierte ich von Wintersemester 1978 bis Wintersemester 1983 an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und erhielt am 1. Dezember 1983 meine Approbation als Tierarzt.

Herrn Prof. Dr. D. Giesecke danke ich für die Überlassung des Themas und den jederzeit gewährten Rat,

Herrn Dr. W. Tiemeyer für die Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Versuche und der Analysen,

den Mitarbeitern des Labors für die ausgezeichnete Zusammenarbeit.